

Recherches sur la Réaction de Gram

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 24 Janvier 1935

DEVANT LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir le Titre de

Docteur de l'Université de Nancy
(Mention Pharmacie)

PAR

Marc BENOIT

Pharmacien diplômé de Microbiologie
Moniteur au Laboratoire de Microbiologie

Né le 7 Juin 1908, à Prény (M.-et-M.)

Examineurs. .	{	MM. LASSEUR.	Président.
		GILLOT.	Juges.
		VERNIER.	

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

1935

Recherches sur la Réaction de Gram

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 24 Janvier 1935

DEVANT LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir le Titre de

Docteur de l'Université de Nancy
(Mention Pharmacie)

PAR

Marc BENOIT

Pharmacien diplômé de Microbiologie
Moniteur au Laboratoire de Microbiologie

Né le 7 Juin 1908, à Prény (M.-et-M.)

Examineurs.	{	MM. LASSEUR.	{	Président.
		GILLOT.		Juges.
		VERNIER.		

NANCY
SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES
1935

UNIVERSITÉ DE NANCY - FACULTÉ DE PHARMACIE

PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN HONORAIRE:

M. BRUNTZ, O. ✱, ☞, I ☞, O. ☞, ☒, ☒, Recteur de l'Université de Nancy

PROFESSEURS HONORAIRES:

MM. FAVREL, ✱, I ☞

GRÉLOT, ✱, I ☞, ☞.

BRUNTZ, O. ✱, ☞, I ☞, O. ☞, ☒, ☒

DOYEN:

M. SEYOT, ✱, ☞, I ☞, ☞, ☒

ASSESEUR:

M. GILLOT, I ☞, ☞

PROFESSEURS:

MM. DOURIS, I ☞, ☞, ☒.....	Toxicologie.
PASTUREAU, O ✱, I ☞, ☒.....	Pharmacie chimique.
SEYOT, ✱, ☞, I ☞, ☞, ☒.....	Histoire naturelle.
LASSEUR, ✱, I ☞, ☞.....	Microbiologie.
GILLOT, I ☞, ☞.....	Matière médicale.
PRÉVOST, ☞.....	Chimie organique.

AGRÉGÉ LIBRE:

M. GIRARDET, ✱, I ☞..... Chimie et Toxicologie.

CHARGÉ DE COURS MAGISTRAL:

M. MEUNIER..... Pharmacie galénique.

CHARGÉS DE COURS:

MM. VERNIER, I ☞.....	Zoologie.
CORDEBARD, I ☞, ☞.....	Analyse chimique.
DONZELOT.....	Physique.

CHEFS DE TRAVAUX:

MM. VERNIER, I ☞.....	Microbiologie et Parasitologie.
CORDEBARD, I ☞, ☞.....	Chimie et Analyse chimique.
STEIMETZ.....	Micrographie.
DONZELOT (chargé de travaux)...	Physique.
RICHARD (chargé de cours)...	Pharmacie.
COLLET (chargé de cours).....	Chimie biologique et Toxicologie.

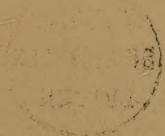
SECRÉTARIAT:

M. E. TRIBOLET, I ☞..... Secrétaire.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.



A MES PARENTS



A mon Maître,

M. LE PROFESSEUR PH. LASSEUR

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.	11
CHAPITRE I. — Historique de la coloration de GRAM..	15
CHAPITRE II. — La méthode primitive de GRAM.....	19
CHAPITRE III. — La valeur qualitative et quantitative de la Réaction de GRAM.....	23
CHAPITRE IV. — La solution colorante.	29
Historique.	29
Etat physico-chimique de la solution co- lorante.	32
Essais de stabilisation.	33
Stabilisation des solutions colorantes... ..	34
Remarques sur la sensittisation.....	36
Préparation des solutions colorantes....	37
Résultats expérimentaux.	39
CHAPITRE V. — Solution iodo-iodurée.	43
CHAPITRE VI. — Le décolorant.	47
CHAPITRE VII. — Coloration de contraste.	53
CHAPITRE VIII. — Modifications à la technique de la colo- ration de GRAM.	58
Technique personnelle.	59
CHAPITRE IX. — Influence de l'âge de la culture.....	66
Recherches personnelles.	72
Résultats expérimentaux:	
A. — Expériences effectuées sur <i>B. me- sentericus niger</i>	74
B. — Expériences effectuées sur <i>B. sub- tilis</i>	81

CHAPITRE X. — Influence du milieu de culture.....	86
CHAPITRE XI. — Rôle de la membrane dans la réaction de GRAM	89
Etude de la membrane chez les Bactéries	90
Théories relatives à la perméabilité de la membrane	94
Facteurs influençant la perméabilité de la membrane	96
Charge des plastides bactériennes.....	96
Réaction du milieu.....	98
CHAPITRE XII. — Fixation du colorant sur les plastides bactériennes	101
Recherches personnelles	108
Résultats expérimentaux :	
A. — Essais effectués avec <i>B. mesen- tericus niger</i>	111
B. — Essais effectués avec <i>B. subtilis</i>	117
CHAPITRE XIII. — Eclatement des plastides bactériennes....	121
A. — Formes éclatées de <i>B. mesente- ricus niger</i>	122
B. — Formes éclatées de <i>B. subtilis</i> ..	123
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	124
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	129

INTRODUCTION

La diagnose des espèces bactériennes présente des difficultés considérables. Cet état de chose tient beaucoup moins au petit nombre de points de repère qu'offre le tableau de la vie des Bactéries, qu'à l'habitude prise par certains Bactériologistes de définir l'espèce bactérienne à l'aide d'un seul caractère. La présence de pyocyanine dans une culture permet d'identifier le germe producteur de ce pigment avec *B. pyocyaneus*. Tous les Microbiologistes sont d'accord sur ce fait. Mais de nombreuses Bactéries chromogènes, soit spontanément, soit par suite de culture dans des conditions spéciales, peuvent perdre leur attribut caractéristique.

Dans la diagnose de l'espèce, nous sommes donc obligés de faire appel à la *subordination des caractères* de B. et A. de JUSSIEU : « *Les caractères doivent être pesés et non comptés* ». Ce que l'on peut traduire en disant qu'il est absolument indispensable, en Microbiologie, de substituer la notion quantitative à la notion qualitative. C'est un point sur lequel LASSEUR (1921-1923) ; LASSEUR, HAEUSSLER et DUPAIX (1930), DUPAIX (1933) ont longuement attiré l'attention des Microbiologistes.

Il n'est donc pas surprenant qu'à mon tour, j'expose des idées qui soient le reflet de l'enseignement de mon Maître : Monsieur le Professeur LASSEUR, et qu'après NEIDE, GRIMME, A. MEYER, LASSEUR et SCHMITT, j'essaie d'étudier la Réaction de GRAM au point de vue quantitatif.

La méthode de GRAM est d'un emploi journalier dans tous les laboratoires de Microbiologie. Elle a rendu des services énormes, elle a causé aussi des déceptions bien amères. Il semblait, au début, que les germes pouvaient se diviser en deux groupes : les Microbes qui restent colorés en violet-noir par la méthode de GRAM et ceux qui se décolorent sous l'action

de l'alcool. On s'est bientôt rendu compte qu'un certain nombre de Bactéries se classent tantôt dans un groupe, tantôt dans l'autre, suivant les conditions d'expériences.

Je dis: *suivant les conditions d'expériences*. En effet, il suffit d'employer deux solutions colorantes quelconques pour obtenir des résultats non identiques, souvent très différents et parfois même tout à fait contradictoires. C'est pour cette raison que j'ai voulu comparer des solutions colorantes possédant le même pouvoir tinctorial.

Les solutions hydro-alcooliques de Violet de gentiane ou de Violet cristallisé ont une durée très éphémère. Elles évoluent très rapidement vers la précipitation mais avec une vitesse variable, suivant leur mode de préparation. Or, au Laboratoire de Monsieur le Professeur LASSEUR, nous utilisons, depuis de nombreuses années, des solutions colorantes stabilisées suivant le procédé décrit par Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et C. MAGUITOT (1931).

De telles solutions colorantes sont remarquablement stables et je ne puis mieux concrétiser ce fait qu'en évaluant leur pouvoir tinctorial en fonction de leur action sur *Staphylococcus aureus*. Lorsqu'on traite successivement ce germe par la solution de Violet de gentiane, de LUGOL et par l'alcool on constate que 93 % des plastides de *Staphylococcus aureus* restent colorées en violet-noir après une heure d'action de l'alcool à 95.

L'emploi de tels réactifs colorants m'autorise donc à comparer les résultats concernant l'influence de l'espèce, de l'âge (c'est-à-dire du stade du cycle d'évolution) et de l'action des électrolytes et des ions OH— sur la méthode de GRAM.

Plan

Dans les chapitres I, II et III, j'étudie l'historique de la coloration de GRAM et la valeur qualitative et quantitative de cette méthode.

Les chapitres IV, V, VI et VII sont consacrés à l'étude de la vitesse de décoloration des Bactéries en fonction des réactifs utilisés. J'accorde une importance toute particulière aux solutions colorantes stabilisées (procédé Ph. LASSEUR, A. DUPAIX, C. MAGUITOT 1931).

Les diverses modifications apportées à la méthode de GRAM et la technique utilisée dans mes expériences sont exposées dans le chapitre VIII.

L'influence du milieu de culture, de l'âge de la culture dans la Réaction de GRAM ressort de la lecture des chapitres IX et X.

Enfin, une importance particulière est attribuée à l'influence des ions H^+ et OH^- sur la méthode de GRAM. La partie expérimentale nécessite logiquement l'exposé des théories relatives à la perméabilité de la membrane et des travaux de Ph. LASSEUR et de ses Collaborateurs sur la fixation des colorants par les plastides bactériennes.

*
**

Avant d'exposer mes recherches sur la Réaction de GRAM, je remercie Monsieur le Recteur BRUNTZ de la bienveillance qu'il m'a témoignée au cours de mes études.

Qu'il me soit aussi permis d'adresser l'expression de ma vive gratitude à mon Maître, Monsieur le Professeur LASSEUR qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et me compter parmi ses élèves. Monsieur le Professeur LASSEUR m'a facilité mon travail en mettant à ma disposition la bibliographie de la Réaction de GRAM, depuis sa découverte en 1884 jusqu'en 1928. De plus, il a tenu à me guider au cours de mes recherches, à vérifier la marche et les résultats de mes expériences. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour l'intérêt qu'il a bien voulu me porter, et mes regrets de n'avoir pu continuer dans la voie qu'il m'a tracée.

Je remercie Monsieur le Docteur VERNIER des conseils qu'il m'a prodigués et de l'aide qu'il m'a apportée dans la réalisation de ce travail.

J'adresse à Monsieur le Professeur GILLOT l'expression de ma vive reconnaissance pour la bienveillance qu'il m'a témoigné et pour avoir accepté de juger ce travail.

Je prie Madame DUPAIX-LASSEUR de croire à mes sentiments de respectueuse reconnaissance. Son aimable obligeance et son précieux concours ne m'ont jamais fait défaut.

A Monsieur MARCHAL, mes sincères remerciements pour l'aide si amicale qu'il n'a cessé de me donner.

C'est grâce à la bonne camaraderie qui règne au Laboratoire de Microbiologie que j'ai pu effectuer certaines de mes expériences. Et je remercie très vivement mes camarades Mlles RENAUX et GROSJEAN, et MM. SIRGUEY, FERRY et REHN, qui se sont efforcés de me faciliter ma tâche.

Je n'oublie pas MM. JACQUOT et SACCHETTI que je mis souvent à contribution.

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE DE LA COLORATION DE GRAM

FRIEDLÈNDER, médecin de la Morgue de Berlin, a signalé, en 1883, une nouvelle méthode de coloration, due à son Collaborateur le Docteur GRAM. Jusqu'alors, les Microbiologistes devaient se contenter, pour mettre en évidence les éléments pathogènes, d'une simple coloration suivie d'une décoloration. Un tel procédé respectait à la fois les microbes et les noyaux cellulaires. Cependant KOCH et EHRLICH, grâce à une technique relativement simple, étaient parvenus à différencier les Bacilles de la tuberculose des éléments cellulaires. Mais cette méthode n'était pas applicable à la recherche de tous les germes pathogènes.

GRAM s'intéressait aux *Cocci* capsulés que l'on rencontre dans la pneumonie, et un heureux hasard le conduisit à la découverte d'une méthode de coloration dont l'intérêt a été croissant de 1884 à 1934.

Par le procédé de GRAM, le Pneumocoque se colorait en Violet intense presque noir tandis que les éléments cellulaires restaient incolores (1). L'illustre savant danois n'avait d'autre but que la mise en évidence des éléments pathogènes dans les préparations de coupes.

L'utilisation systématique de la méthode de coloration pour la recherche des Bactéries pathogènes devait mettre en lumière

(1) Ou se coloraient en brun lorsqu'on utilisait la coloration de contraste au Brun Bismarck « *double coloration* » des Microbiologistes.

ce fait assez curieux : un grand nombre de Bactéries se colorent en Violet intense, tandis que d'autres germes, se comportant comme les éléments cellulaires, se décolorent sous l'action de l'alcool absolu.

Dès ce moment, il apparut que la méthode de Gram était appelée à jouer un rôle capital dans la diagnose des germes et à rendre des services signalés dans l'étude systématique des Bactéries.

Les Bactéries se divisaient en deux catégories nettement tranchées : les Bactéries qui restent colorées en violet-noir par la méthode de GRAM « *germes prenant le GRAM* » et celles qui se décolorent dans cette technique « *germes ne prenant pas le GRAM* ». (1).

Cette conception a prévalu durant de nombreuses années. Il fallut arriver aux travaux de l'Ecole Allemande pour comprendre qu'il ne s'agissait là que d'une première approximation : un germe pouvant être classé tantôt dans l'une des catégories, tantôt dans l'autre suivant les conditions d'expériences.

En effet, réalisons dans un tube d'eau physiologique un mélange de *B. sphaericus* A. M., de *B. tumescens*, de *B. megatherium* Henze. Déposons une goutte de cette suspension sur une série de lames porte-objet a, b, c, d, et étalons ces gouttes.

Après dessiccation, fixons à la chaleur les préparations. Soumettons les étalements à l'action d'une solution de Violet de gentiane pendant 2 minutes, puis à celle d'une solution de LUGOL durant le même temps. Enfin, faisons agir l'alcool à 80 pendant des temps déterminés.

Dans ces conditions d'expériences, et en prenant comme test de décoloration la teinte indiquée par NEIDE (1904), nous constatons :

(1) Ou suivant l'expression des Ecoles Allemande et Américaine germes « GRAM-positifs » et germes « GRAM-négatifs ».

Que certains germes sont déjà décolorés après quelques secondes d'action de l'alcool (*B. sphaericus* A. M.) (2). *B. megatherium* au contraire, ne perdra la coloration violet-noir intense qu'après 40 minutes de séjour dans l'alcool et *B. tumescens* exigera même un temps de contact de 1 heure 30.

En d'autres termes, toutes les Bactéries se décolorent par la méthode de GRAM, mais la « *vitesse de décoloration* » varie avec l'espèce considérée.

Des facteurs autres que l'espèce peuvent modifier le temps nécessaire à la décoloration des plastides bactériennes et la vitesse de décoloration d'un germe donné n'a de valeur déterminée que pour des conditions d'expériences définies.

Les facteurs qui régissent la coloration de GRAM peuvent se diviser en deux groupes :

1° Facteurs dépendant des réactifs utilisés : solutions colorantes (Violet de gentiane, Fuch sine de GRAM), solution iodoiodurée et décolorant.

2° Facteurs pouvant entraîner des modifications physico-chimiques de l'élément bactérien : espèce, stade de développement, milieu de culture (nature et réaction), réaction du milieu de dispersion.

L'étude détaillée de tous ces facteurs d'action dépasse considérablement le cadre de ce mémoire. Je me suis donc limité à l'étude : 1° des solutions colorantes ; 2° de l'espèce bactérienne ; 3° de l'âge de l'élément bactérien ; 4° de l'action des ions OH—.

Dans tout travail scientifique, l'exposé des résultats expérimentaux doit être précédé d'un aperçu historique. Je me limiterai à GRAM et aux Savants qui se sont intéressés aux quatre facteurs d'action ci-dessus.

(2) Les durées de décoloration sont celles données par NEIDE (1904).

CHAPITRE II

LA MÉTHODE PRIMITIVE DE GRAM

En 1883, le D^r FRIEDLÆNDER met en évidence le germe de la pneumonie, et son élève, le D^r GRAM cherche de nouvelles méthodes de coloration qui permettent de déceler facilement les *Cocci* dans les préparations de coupes de poumons infectés.

Par un heureux hasard, le savant danois trouve une coloration par laquelle les noyaux et les autres éléments des tissus restent incolores tandis que les *Cocci* ressortent fortement colorés en violet-noir.

Le protocole indiqué par GRAM (1884) est le suivant :

1° Les coupes de tissus conservées dans l'alcool absolu sont placées directement dans la solution de Violet de gentiane d'EHRlich pendant une à trois minutes.

2° Au sortir du bain colorant, les préparations peuvent être lavées légèrement dans l'alcool.

3° Elles sont alors soumises de une à trois minutes à l'action de la solution de LUGOL (1).

4° Les coupes sont complètement décolorées dans l'alcool absolu.

5° Elles sont éclaircies à l'huile d'œillette.

GRAM conseille : 1° l'emploi d'une solution de Brun Bismarck

(1) La solution de LUGOL utilisée par GRAM est composée de :
1 gr. d'iode ;
2 gr. d'iodure de potassium ;
300 centimètres cubes d'eau.

ou de Vésuvine pour obtenir une « *double coloration* » ;
2° une nouvelle déshydratation des coupes à l'alcool. Les éléments décolorés prennent une teinte brune.

GRAM utilise la solution de Violet de gentiane anilinée d'EHRlich.

EHRlich préparait l'eau d'aniline en agitant 5 cm³ d'huile d'aniline avec 100 cm³ d'eau pendant quelques minutes. Puis il ajoutait goutte à goutte à l'eau d'aniline une solution saturée de Violet de gentiane jusqu'à formation de particules irisées à la surface du liquide.

Dans sa première publication, GRAM indique la possibilité de se servir d'agents décolorants autres que l'alcool absolu. C'est ainsi qu'il utilise (avec moins de succès cependant) l'alcool additionné de 3 % d'acide chlorhydrique ou acétique.

En résumé, l'amélioration que GRAM apporte dans la technique de coloration des coupes réside dans l'utilisation d'une solution d'iode dans l'iodure de potassium. Ce réactif forme une combinaison violet-noir avec la solution colorante de Violet de gentiane. Ce complexe résiste ou ne résiste pas à l'action décolorante de l'alcool.

Au cours de ses recherches, GRAM constate qu'un certain nombre de « *Schizomycètes* » restent colorés en violet-noir par sa méthode : ce sont les *Cocci* de la pneumonie, le Bacille de la pyämie, le Bacille de la tuberculose, etc... Par contre, d'autres germes sont décolorés : tels certains *Cocci* encapsulés, le Bacille typhique, etc...

Pour GRAM, le fait que diverses Bactéries ne résistent pas à l'action de l'alcool était dû à un défaut de sa méthode, et au sujet de ses résultats, il écrit notamment : « *Je me rends compte qu'ils sont encore défectueux et remplis de lacunes* ». Mais GRAM sait accepter cette apparente imperfection, et il espère que sa méthode de coloration sera utile aux autres Chercheurs, et qu'elle pourra servir à la diagnose des germes.

La méthode de GRAM a pris depuis 1884 de plus en plus

d'importance ; elle a été adoptée par tous les Laboratoires. De nombreux auteurs se sont attachés à la perfectionner, à la préciser, et, malgré tous les moyens mis à la disposition des chercheurs, la méthode de GRAM reste un des principaux moyens de caractérisation des Bactéries.

CHAPITRE III

LA VALEUR QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE LA RÉACTION DE GRAM

Pour bien comprendre l'orientation donnée aux travaux effectués sur la méthode de GRAM, il ne faut pas oublier que, jusqu'en 1884, les Microbiologistes s'efforçaient surtout de rechercher les germes dans le matériel infectieux (pus, sang, coupes de tissus). Or, si on excepte les techniques de KOCH et d'EHRlich, on ne possédait pas de procédé permettant de colorer électivement les Bactéries. Aussi, la découverte du savant danois devait elle frapper vivement l'attention des Microbiologistes. Par sa méthode de coloration, GRAM mettait en évidence certains *Cocci*: *Cocci* de la pyämie et de diverses infections.

Cependant, le fait que certaines Bactéries ne se coloraient pas par la méthode de GRAM, quelles que soient les précautions prises, semblait bien démontrer que la non-colorabilité de ces Bactéries par la nouvelle technique était due à une propriété caractéristique des germes. Il semblait déjà que certains micro-organismes pouvaient se colorer en violet-noir par la méthode de GRAM; et que d'autres ne résistaient pas à l'action de l'alcool. On fut ainsi conduit à la notion de « *double coloration* », mais, pour la faire entrer dans le domaine pratique, il devenait nécessaire de découvrir un colorant doué de propriétés électives non seulement vis-à-vis des éléments anatomiques, mais aussi à l'égard des germes qui ne résistaient pas à l'action du décolorant.

Peu à peu, la méthode s'impose, elle acquiert plus de précision et devient un élément de diagnose possible des Bactéries.

Enfin, la majorité des Bactériologistes est conduite à admettre l'existence de deux catégories de germes : ceux qui « prennent le GRAM » et ceux qui « ne le prennent pas ».

Une telle discrimination devait bientôt se montrer insuffisante. Le Gonocoque est décrit par certains auteurs (TOUTON 1894, CANEVA 1894, KRAL 1894), comme « prenant le GRAM » ; pour G. ROUX (1885) ALLEN et WENDT (1889) il se décolore au contraire d'une façon régulière. A. HOGGE (1893) et HYMANS VAN DER BERG (1896) expliquent ces résultats contradictoires par le fait que ces auteurs ne se placent pas dans les mêmes conditions d'expériences.

De même, M. CLAUDIUS (1897) fait remarquer que *B. aedematis* et *B. chauveii* sont rangés tantôt comme « prenant le GRAM » tantôt comme « ne le prenant pas ». La modification apportée par CLAUDIUS à la méthode de GRAM permet d'obtenir des résultats constants pour ces deux germes.

Mais à mesure que les essais se multiplient, le nombre des exceptions augmente et on est bientôt convaincu de l'insuffisance de la notion qualitative qui doit faire place à la notion quantitative, ceci grâce aux travaux de GRIMME (1902), NEIDE (1904), ARTHUR MEYER (1912) et Ph. LASSEUR (1927).

GRIMME (1902) signale déjà qu'il n'y a pas de limites bien nettes entre les Bactéries qui « prennent le GRAM » et celles qui « ne le prennent pas ». Il conclut à des variations dans le mode de décoloration des différentes espèces bactériennes et même des plastides prises individuellement pour une espèce donnée.

Un autre élève d'ARTHUR MEYER, NEIDE précise la valeur de la notion de décoloration et introduit la « durée de décoloration » « GRAM-dauer », c'est-à-dire le temps nécessaire pour atteindre la « couleur-test », de décoloration. Il montre que ce temps est caractéristique de l'espèce bactérienne, et que

l'allure de la décoloration est placée sous la dépendance de différents facteurs.

Pour NEIDE, la vitesse de décoloration, dans la méthode de GRAM, doit rendre possible la diagnose d'espèces et la classification systématique de groupes d'espèces. Mais, « *pour que la décoloration de GRAM puisse servir de caractéristique d'espèce, il faut qu'elle puisse donner constamment les mêmes résultats pour une espèce donnée* ».

A l'expression de « *GRAM-dauer* » de NEIDE, Ph. LASSEUR préfère celle de « *Vitesse de décoloration* » qui indique plus nettement l'allure du phénomène: toutes les Bactéries se colorent sous l'action successive du Violet de gentiane et de l'iode, toutes se décolorent sous l'action de l'alcool. Mais la vitesse de décoloration est extrêmement variable; elle est de quelques secondes pour :

<i>B. typhosus</i>	2" (LASSEUR et SCHMITT) (1)
<i>B. pyocyaneus</i>	3" (LASSEUR et SCHMITT)
<i>B. chlororaphis</i>	4" (LASSEUR et SCHMITT)
<i>B. Le Monnier</i>	5" (LASSEUR et VERNIER)
<i>B. caryocyaneus</i>	5" (A. DUPAIX)

et elle est de l'ordre de quelques minutes pour :

<i>B. sphaericus</i>	1' 5" (NEIDE)
<i>B. alvei</i> KROMPECHER	6' (LASSEUR et SCHMITT)
<i>B. mesentericus fuscus</i>	21' (SCHMITT)
<i>B. megatherium</i>	42' (NEIDE)
	55' (SCHMITT)
<i>B. lactis</i>	92' (NEIDE)

(1) A cette époque, Ph. LASSEUR n'utilisait pas encore des solutions colorantes stabilisées, et malgré toutes les précautions prises dans la préparation des solutions de Violet de gentiane, celles-ci ne présentaient pas un fort pouvoir tinctorial. (Communication orale.)

Enfin, avec d'autres germes, il faut faire agir l'alcool pendant des temps beaucoup plus longs pour atteindre la « *couleur-test* » de décoloration.

En plusieurs occasions, Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs se sont attachés à l'étude des différents facteurs influençant la Réaction de GRAM: influence de l'âge des Bactéries, du milieu, de l'état des solutions colorantes, et du décolorant (1927); influence des solutions hydro-alcooliques de Violet de gentiane stabilisées (1931-1932).

LASSEUR pense que la coloration de GRAM peut servir à la diagnose et non à la caractérisation de l'espèce bactérienne. Il n'entre pas dans la pensée de l'auteur d'identifier un germe par une seule de ses propriétés, mais pour remplir ce rôle limité, la Réaction de GRAM doit être réalisée dans des conditions nettement définies, tout aussi bien en ce qui concerne les Réactifs que les Bactéries elles-mêmes (milieu, âge de culture, etc...).

Sous ces réserves, on conçoit qu'une Bactérie qui se décolore en 6 minutes doit être fondamentalement différente d'une plastide qui exige 6 heures d'action du décolorant pour perdre sa coloration violet-noir.

Si la coloration de GRAM, en tant que réaction quantitative permet d'établir des groupes dans la systématique des Bactéries, il n'est pas illogique d'espérer de nouvelles coupures dans les deux grands groupes: germes qui « *prennent le GRAM* » et germes qui « *ne le prennent pas* » à la condition d'utiliser des décolorants convenables.

C'est ainsi, par exemple, que l'alcool amylique permet de différencier très nettement le Bacille dysentérique de SHIGA du Vibrion cholérique puisque le second se décolore en 45 secondes et que le premier exige un temps d'action de l'alcool amylique de 28 minutes; de même, et ce fait a une grosse importance, le Bacille de FLEXNER se décolore en 5 minutes, le Bacille de SHIGA en 28 minutes.

Avec l'acide acétique, on observe des variations tout aussi

importantes. *B. Le Monnieri* exige un temps supérieur à 24 heures alors qu'il se décolore en quelques secondes sous l'action de l'alcool. L'acide acétique permet de différencier le Bacille dysentérique de FLEXNER du Bacille de SHIGA. Les vitesses de décoloration sont de 6 minutes pour le Bacille de FLEXNER et de 24 heures pour le Bacille de SHIGA. Remarquons le parallélisme d'action entre l'alcool amylique et l'acide acétique.

Ce fait : à savoir la possibilité de caractériser certaines Bactéries dites « *ne prenant pas le GRAM* » en utilisant des décolorants convenables avait frappé Ph. LASSEUR. C'est dans la recherche du décolorant spécifique de chaque espèce bactérienne que Ph. LASSEUR avait voulu orienter les travaux de ses Collaborateurs et de G. COUDRAY, en particulier. On sait que cet auteur a traité la question d'un point de vue différent. De même, il ne m'a pas été possible de continuer dans la voie indiquée par mon Maître pour des raisons de temps indépendantes de ma volonté.

CHAPITRE IV

LA SOLUTION COLORANTE

La coloration de GRAM est sous la dépendance de plusieurs facteurs : le plus important est incontestablement la solution colorante.

Dans sa technique primitive, GRAM utilisait la solution de Violet de gentiane phéniquée d'EHRlich. Depuis la découverte de GRAM, de nombreux auteurs ont tenté d'améliorer la préparation des solutions colorantes. Il est donc nécessaire d'esquisser dans les grandes lignes les tentatives effectuées jusqu'à ce jour. Une importance toute particulière sera donnée au procédé de stabilisation des solutions colorantes préconisé par Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs (1931-1932).

Historique

De 1850 à 1860, les colorants naturels, tels que le carmin, l'hématoxyline, le safran étaient seuls utilisés pour la coloration des coupes. Mais en 1856, PERKIN montrait qu'il était possible de fabriquer des matières colorantes artificielles. Cette découverte devait doter l'histologie de techniques nouvelles. C'est ce qu'HERMANN (1875), puis FLEMMING (1881) s'efforcent de réaliser, en appliquant les matières colorantes artificielles à l'étude des préparations cytologiques.

Les colorants artificiels, dans des conditions déterminées, présentent une affinité élective pour des éléments anatomiques donnés. Bientôt EHlich fait faire un grand progrès aux méthodes de coloration élective, en utilisant des colorants d'aniline

basiques en solution acide et après fixation des préparations par l'acide chromique.

Dans le domaine de la Microbiologie, WEIGERT (1887) avait signalé la possibilité de colorer les micro-organismes par les colorants d'aniline, mais il a fallu attendre les travaux d'EHRlich et ceux de KOCH (1877) pour que cette idée prenne toute son importance. Dans les expériences de KOCH, les colorants d'aniline permettent la mise en évidence et la différenciation des Bactéries.

EHRlich abandonne la méthode de fixation des préparations à l'acide chromique : il utilise un chauffage à 120-130° C. Puis KOCH améliore cette technique en fixant les produits pathologiques par un chauffage de 2 à 3 minutes à 120-130° C. et finalement il propose simplement de passer les préparations trois fois dans la flamme non éclairante du gaz.

KOCH montre que dans l'étude du matériel bactérien on obtient de meilleurs résultats en déplaçant un colorant par un autre : la Vésubine déplace le Bleu de méthylène en solution aqueuse additionnée de potasse.

EHRlich ne conteste pas les résultats de KOCH, mais il en donne une interprétation différente : les résultats obtenus par celui-ci devant être attribués à l'alcalinité de la solution colorante, EHRlich substitue, à la potasse, de l'aniline qui renforce la coloration du Bleu de méthylène.

Toutes les Bactéries ne se comportent pas de la même façon : c'est ainsi que les Bacilles tuberculeux colorés par une solution anilinée résistent au déplacement par la Vésubine, et pour les décolorer, il faut l'action énergique d'un acide : l'acide nitrique au 1/3. EHRlich mettait ainsi en évidence la propriété acido-résistante du Bacille tuberculeux.

Contrairement à ce que croyait EHRlich, l'aniline n'agit pas par son caractère basique, mais bien d'une façon qui lui est particulière et ZIEHL démontre bientôt que l'alcalinité de la solution colorante ne joue aucun rôle dans la coloration du Ba-

cille tuberculeux. En effet, l'acide phénique, la résorcine, le pyrogallol, etc.. donnent aux solutions le même pouvoir tinctorial que l'aniline.

Avec les travaux de UNNA (1898), de M. NICOLLE (1891), les Microbiologistes revinrent aux solutions colorantes phéniquées qui avaient été délaissées depuis GRAM (1884).

GRAM préparait en effet sa solution suivant la technique d'EHRICH avec de l'eau d'aniline : 5 cm³ d'huile d'aniline étaient agités pendant quelques minutes avec 100 cm³ d'eau ; à la solution obtenue, le savant danois ajoutait goutte à goutte une solution saturée de Violet de gentiane jusqu'à formation de pellicules irisées à la surface du liquide. Ce procédé offre le grave inconvénient d'opérer sur des quantités inconnues (1) 1° d'aniline ; 2° de colorant.

En présence de ces faits, on n'est pas surpris si, actuellement, différentes méthodes sont utilisées pour la préparation des solutions colorantes : méthodes de valeurs tout à fait inégales, mais que nous signalons, ne serait-ce que pour mettre le Lecteur en garde contre certaines techniques simplifiées.

Etudions maintenant les procédés les plus usités :

1^{er} *Procédé.* — On additionne la solution alcoolique colorante d'une solution d'acide phénique ou d'eau d'aniline.

Lorsqu'on ajoute une solution d'acide phénique à une solution hydro-alcoolique de colorant, on obtient des résultats très différents suivant le mode d'apport de l'acide phénique. Si le mélange est effectué sans précaution, la précipitation du colorant est presque immédiate.

2^e *procédé.* — Le colorant et l'acide phénique sont triturés au mortier puis dissous dans une petite quantité d'alcool. A cette solution alcoolique on ajoute par petites quantités l'eau distillée.

(1) Et variables d'une expérience à l'autre.

3^e procédé. — Certains auteurs préfèrent utiliser une solution aqueuse (1) de colorant. Le colorant est agité avec de l'eau puis laissé en contact quelques heures et filtré.

ÉTAT PHYSICO-CHIMIQUE DE LA SOLUTION COLORANTE

UNNA a donné une importance particulière à l'état physico-chimique des solutions colorantes. Ce savant constate que l'addition « d'alcali » aux solutions colorantes basiques amène la précipitation des « bases colorantes ».

Par contre, une très faible quantité « d'alcali » ne détermine aucune précipitation et, chose inattendue, augmente le pouvoir tinctorial de la solution colorante (2).

Ceci s'explique par la différence de solubilité du colorant : une couleur s'unit d'autant plus facilement à un tissu qu'elle est moins soluble dans le solvant, sans toutefois être au stade de la précipitation. « C'est ce qu'on réaliserait lorsqu'on ferait passer le colorant de l'état de solution (cristalloïde) à l'état de solution colloïdale » (Ph. LASSEUR, 1931).

Entre ces deux états extrêmes : solution et précipitation, le « liquide colorant » présente un stade de transition : le « stade préparatoire » à la précipitation ou « Schwebefällung » de UNNA, que Ph. LASSEUR (1931) définit ainsi : « Les solutions alcooliques de colorants basiques ne sont pas, en général, résolubles à l'ultramicroscope. Or, l'addition d'eau phéniquée ou d'eau alcalinisée à ces solutions alcooliques fait apparaître dans ces systèmes irrésolubles un nombre plus ou moins considérable de granules. A un stade un peu plus avancé, les granules se rassemblent en de très petits amas et, à ce moment, la « solution colorante » ne présente pas de dépôt important dans le vase qui la renferme, mais elle montre une fine pelli-

(1) Solution à 1 %.

(2) Les acides diminuent le pouvoir tinctorial des solutions colorantes basiques d'aniline.

cule à la surface libre du liquide. De plus, elle dépose rapidement une mince pellicule sur la paroi du récipient. »

La solution colorante est donc en état de modifications physico-chimiques constantes; elle évolue plus ou moins rapidement vers la précipitation; par suite, son pouvoir tinctorial est variable; il atteindrait le maximum au stade du « *trouble naissant* ».

ESSAIS DE STABILISATION

Pour obtenir des résultats constants et surtout pour des recherches d'ordre quantitatif, certains Microbiologistes ont essayé de retarder la précipitation de la solution colorante par addition de colloïdes hydrophiles (COUDRAY, 1929) ou mieux de « *stabiliser* » les solutions colorantes contre la précipitation par apport de *petites doses* d'acide phénique (Ph. LASSEUR, 1931). BOUTARIC a montré qu'il est possible de « *vacciner* » les solutions colloïdales vis-à-vis de la précipitation d'un électrolyte.

Les mordants. — Dans l'esprit de certains auteurs, l'eau d'aniline et l'acide phénique devaient jouer le rôle de mordant. Ces substances produisent « *la précipitation ou la fixation sur les fibres des matières colorantes qui n'ont que peu ou pas d'affinités pour elles* » (SANSONNE, 1920). De plus, les mordants se combinent avec les colorants et en particulier avec les dérivés de la pararosaniline. Ils provoquent la « *Schwebefällung* » ou « *trouble naissant* » de UNNA.

L'apport d'acide phénique dans une solution de Violet de gentiane augmente les dimensions de la phase dispersée: il en résulte une accélération de l'évolution des suspensions vers la précipitation.

En ajoutant, sans précaution, à la solution colorante, une solution d'acide phénique (à 2 ou à 5 %), on obtient une précipitation plus ou moins rapide de la substance colorante.

La précipitation est même instantanée lorsque le mélange des solutions est soumis à l'agitation. Les solutions hydro-alcooliques non phéniquées précipitent, elles aussi, avec le temps, mais leur vitesse de précipitation est plus faible que celle des solutions phéniquées.

Pour certains auteurs tels que JENSEN, BURKE (1929), les solutions colorantes aqueuses, c'est-à-dire non additionnées d'alcool restent stables pendant plus ou moins longtemps si on s'abstient de tout apport de mordant. De telles solutions ont un pouvoir tinctorial très faible et on ne saurait conseiller leur emploi dans la Réaction de GRAM.

STABILISATION DES SOLUTIONS COLORANTES

Ces généralités étant établies, je vais aborder le problème complexe de la stabilisation des solutions colorantes.

L'ensemble des faits que nous venons d'examiner montre que les électrolytes jouent un rôle capital dans la précipitation des solutions colorantes. Le problème de la stabilisation des solutions se ramène donc surtout à l'obtention de solutions insensibles aux électrolytes.

Les physico-chimistes que préoccupe l'étude des solutions colloïdales se sont efforcés depuis longtemps de s'opposer à l'évolution quasi fatale de toutes les suspensions. La protection ou la sensibilisation constitue un des chapitres importants de la chimie colloïdale.

Les chimistes se sont d'abord efforcés de « stabiliser » les solutions colloïdales par l'apport de colloïdes hydrophiles tels que l'albumine, la caséine, la gélatine, etc..

Les résultats obtenus ne s'inscrivent pas toujours dans le même sens. Cela tient à ce qu'un colloïde hydrophile peut se comporter de façon variable. Aux fortes concentrations, il joue le rôle de colloïde protecteur, et aux faibles concentrations, celui de « sensibilisateur », c'est-à-dire qu'il augmente la sensibilité du colloïde à protéger vis-à-vis des électrolytes.

Dans le domaine de la Microbiologie, G. COUDRAY (1929), à l'instigation de M. le Professeur Ph. LASSEUR, a été conduit à utiliser la propriété stabilisante des colloïdes hydrophiles.

Il essaie de stabiliser les solutions colorantes ou du moins de les fixer au stade inévitable que détermine l'addition de l'acide phénique.

COUDRAY recherche le colloïde doué du pouvoir protecteur le plus élevé. A cet effet, il étudie la valeur protectrice de la gélatine, de la gomme arabique, du blanc d'œuf et de la glycérine.

Des expériences de COUDRAY, il résulte que :

1° La gélatine exerce une action protectrice manifeste et la concentration optima semble être de 0 gr. 083 de gélatine pour 100 cm³ de solution colorante. En effet, des quantités inférieures de gélatine ne protègent pas les solutions contre la précipitation : et des quantités supérieures à 0 gr. 083 provoquent l'empatement des préparations.

2° L'albumine du blanc d'œuf n'aurait pratiquement aucune action protectrice.

3° La gomme arabique précipite la solution colorante.

4° La précipitation étant fonction de la viscosité du milieu, on pouvait songer à retarder la précipitation par addition de glycérine. L'expérience montre que la glycérine à elle seule ne jouit pas d'une action protectrice importante. De plus, lorsqu'elle est additionnée à un colloïde hydrophile X, le mélange colloïde X + glycérine ne jouit pas d'une action protectrice plus grande que le colloïde X seul.

Lorsqu'on étudie la précipitation des solutions colorantes en fonction, non pas de l'acide phénique ajouté, mais bien du temps et des électrolytes cédés par le verre, on constate que la gélatine jouit d'une propriété protectrice incontestable mais variable avec la concentration de gélatine utilisée. Pour

augmenter d'une façon sensible la vie des solutions colorantes, il faut utiliser des concentrations comprises entre 0 gr. 125 et 0 gr. 05 de gélatine pour 100 cm³ de solution.

En modifiant le mode de préparation des solutions colorantes, G. COUDRAY augmente la stabilité de celles-ci. Il ajoute l'acide phénique à la solution de Violet de gentiane en deux fois: 0 cm³ 25 au 2^e temps de sa méthode, et 7 cm³ 75 au 3^e temps. Entre chaque apport d'acide phénique, la solution colorante est laissée au repos pendant 12 heures.

REMARQUES SUR LA SENSITISATION

(D'après Ph. LASSEUR, 1932).

Lorsqu'on ajoute un colloïde hydrophile ou stable à un colloïde hydrophobe ou instable, on observe suivant les concentrations utilisées :

« 1° Un accroissement de sensibilité de la suspension vis-à-vis des électrolytes.

2° Un effet protecteur vis-à-vis des mêmes électrolytes.

3° Une floculation en l'absence de tout électrolyte » (BOUTARIC, 1926).

Ce pouvoir protecteur, observé par ZSIGMONDY (1901), fut nettement mis en évidence par V. HENRI et ses élèves.

BOUTARIC (1931) constate un nouveau phénomène: « *La protection qu'exerce l'addition d'un électrolyte en quantité faible contre la floculation produite par les doses plus fortes du même électrolyte* ».

C'est ce phénomène inattendu qui a conduit Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs à appliquer le phénomène de BOUTARIC à la préparation des solutions colorantes phéniquées.

PRÉPARATION DES SOLUTIONS COLORANTES

La préparation des solutions colorantes exige :

1° Une solution alcoolique de colorant à 10 % : le colorant est pulvérisé puis dissous dans l'alcool à 95. On filtre cette solution.

2° Une solution de gélatine à 0,2 %.

La gélatine est dissoute à 40-50° C., filtrée et utilisée à cette température.

3° Une solution d'acide phénique à 5 %.

On mélange les trois solutions de la façon suivante :

A 50 cm³ de la solution alcoolique de colorant, on ajoute lentement 200 cm³ de la solution de gélatine.

La solution hydro-alcoolique ainsi obtenue est placée à l'étuve à 37° C. pendant 24 heures. Puis on procède à l'addition de l'acide phénique d'après le protocole suivant (1) donné par Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et C. MAGUITOT (1931).

1 ^{er} jour.....	0.05 cm ³ de la solution phéniquée à 5 %	
2 ^e jour.....	0.10	«
3 ^e jour.....	0.50	«
4 ^e jour.....	1.00	«
5 ^e jour.....	5.00	«
6 ^e jour.....	10.00	«
7 ^e jour.....	25.00	«
8 ^e jour.....	50.00	«
9 ^e jour.....	50.00	«
10 ^e jour.....	108.35	«

Total..... 250.00 cm³ de la solution phéniquée à 5 %

(1) La solution colorante est maintenue pendant ce temps à la température du laboratoire.

Après addition des 250 cm³ de la solution d'acide phénique, la solution colorante est laissée au repos à la température du laboratoire pendant 4 jours, puis filtrée.

On obtient d'excellents résultats à la condition expresse de se conformer au protocole ci-dessus. **Il ne faut jamais chercher à gagner du temps par l'augmentation trop rapide des quantités d'acide phénique.**

De plus, il faut éviter soigneusement toute agitation du liquide pendant l'addition de l'acide phénique. On ne doit donc pas laisser tomber la solution d'acide phénique dans le liquide, mais la déposer au contact de la solution colorante.

A la condition de suivre ces prescriptions, on obtient finalement une solution phéniquée rigoureusement dépourvue de précipité et qui, par filtration, ne laisse aucun résidu sur le filtre de papier.

Les défauts de technique se traduisent non seulement par une précipitation plus ou moins abondante du colorant, mais encore par une diminution du pouvoir tinctorial de la solution.

Par application du phénomène de BOUTARIC, Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs ont préparé des solutions stables à l'aide de colorants de marques diverses et de composition chimique différente.

L'évaluation du pouvoir tinctorial de ces solutions a été mesurée en prenant comme matériel d'étude *Staphylococcus aureus*. « Ce germe offre en effet une assez grande constance de colorabilité. Les différentes parties d'une solution colorante donnent avec diverses cultures de *Staphylococcus aureus* âgées de 24 heures des temps de décoloration assez voisins les uns des autres pour que l'on puisse songer à évaluer le pouvoir tinctorial d'une solution de Violet phéniquée en fonction du temps de décoloration » (Ph. LASSEUR, 1927).

Détermination du pouvoir tinctorial. — Ph. LASSEUR évalue le pouvoir tinctorial des solutions colorantes de deux façons :

1° D'après le pourcentage de plastides de *Staphylococcus aureus* (1) colorées en violet-noir après 60 minutes d'action du décolorant.

2° En fonction du temps d'action du décolorant nécessaire à l'obtention d'un pourcentage de plastides colorées en violet-noir, égal à 90.

Les solutions colorantes stabilisées suivant le phénomène de BOUTARIC montrent un très fort pouvoir tinctorial, même âgées de 18 à 30 mois. Elles offrent, 18 mois après leur préparation, de 80 à 90 % des plastides de *Staphylococcus aureus* colorées en violet-noir pour un temps de contact de 10 à 20 minutes avec l'alcool à 95.

L'influence de l'apport de petites doses d'acide phénique sur la stabilisation des solutions hydro-alcooliques de Violet de gentiane est incontestable. De telles solutions sont rendues « pratiquement insensibles à l'action précipitante des grandes doses d'acide phénique et des ions cédés par le verre » (Ph. LASSEUR, 1931). Le phénomène de BOUTARIC est donc appelé à rendre les plus grands services en Microbiologie.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et C. MAGUITOT (1931), A. DUPAIX et M.-A. RENAUX (1932) ont publié des résultats obtenus dans la détermination du pouvoir tinctorial de différentes solutions colorantes stabilisées suivant le procédé décrit par ces Auteurs.

J'ai repris l'étude de quelques unes de ces solutions colorantes stabilisées, qui étaient âgées de 4 à 5 ans au moment de mes essais.

Ces solutions offraient des aspects très voisins. Cependant on peut les classer en deux groupes :

les solutions qui ne renfermaient pas de précipité apparent :

(1) En culture de 24 heures,

les solutions qui présentaient un très léger dépôt au fond du flacon où elles sont conservées.

Le pouvoir tinctorial des différentes solutions a été évalué en fonction du pourcentage des plastides de *Staphylococcus aureus* colorées encore en Violet-noir après 60 minutes d'action de l'alcool à 95.

Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau I.

TABLEAU I

Pourcentage des plastides de *Staphylococcus aureus* colorées en Violet-noir après 60 minutes d'action du décolorant

Désignation du colorant (1)	Nature du flacon	N° des solutions	Etat de la solution	Solutions âgées de	
				5 ans	4 ans
Violet de Gentiane (Grübler)	flacon Pyrex	1	pas de précipité apparent	93 %	—
Violet cristallisé (R. A. L.)	bout. Vittel	2	pas de précipité apparent	—	93 %
Violet de Gentiane (R. A. L.)	bout. Vittel	3	pas de dépôt apparent (2)	—	94 %
Violet de Gentiane (Microcolor)	flacon Pyrex	4	léger dépôt	—	90 %
Violet de Gentiane (Microcolor)	bout. Vittel	5	léger dépôt	—	91 %
Violet cristallisé (Microcolor)	flacon Pyrex	6	pas de précipité apparent	—	94 %

De l'examen de ce tableau, il résulte que :

1° La solution de Violet de gentiane âgée de 5 ans a conservé presque intacte son pouvoir tinctorial.

2° Les solutions colorantes, vieilles de 4 ans, offrent encore une intensité colorante élevée. Les solutions 2, 3, et 6 donnent :

(1) Colorant utilisé pour la préparation des solutions phéniquées.

(2) L'épaisseur du verre ne permet pas d'être affirmatif.

93 à 94 % de plastides colorées en violet-noir après une heure d'action du décolorant. Avec les solutions 4 et 5 ce pourcentage n'est plus que de 90 à 91.

En résumé, le procédé décrit par Ph. Lasseur, A. Dupaix et C. Maguitot, en application du phénomène de Boutaric, permet d'obtenir des solutions d'une assez grande stabilité et de très longue conservation. Les solutions colorantes phéniquées stabilisées peuvent rendre de grands services dans la Réaction de Gram.

CHAPITRE V

SOLUTION IODO-IODURÉE

Si la solution colorante présente un intérêt primordial dans l'étude de la méthode de GRAM, nul ne contestera cependant qu'on ne saurait négliger l'importance de la solution iodo-iodurée et du décolorant.

J'étudierai tout d'abord la solution iodo-iodurée.

On sait que la vitesse de décoloration est fonction de la composition de la solution iodo-iodurée, de sa concentration, etc... De plus, les différents essais d'explication de la méthode de GRAM se ramènent à l'action de l'iode : perméabilité différente chez les diverses espèces bactériennes (BRUDNY, 1908), perméabilité de la membrane à l'iode (BENIANS, 1919), formation d'une combinaison *tissu-colorant-iode*, qui reste intacte ou qui est démolie sous l'action du décolorant en libérant un complexe *iode-colorant* (théorie chimique de UNNA (1886), de Ph. EISENBERG (1909).

GRAM utilisait une solution de LUGOL répondant à la composition suivante :

Iode.	1 gr.
Iodure de potassium.....	2 gr.
Eau.	300 cm ³

et il n'avait obtenu des résultats satisfaisants qu'avec cette seule solution.

Cependant UNNA propose l'emploi de la teinture d'iode et il obtient de très belles colorations en utilisant des vapeurs d'iode ou de l'iode à l'état naissant produit par action de l'eau oxygénée sur de l'iodure de potassium.

Il est difficile de donner une explication simple de l'action de l'iode dans la méthode de GRAM. Dans la solution de LUGOL, l'iode est tri-atomique, tandis qu'il est mono-atomique dans l'iodure de potassium.

Cette différence de valence pourrait être la cause de l'action différente des solutions iodées. Mais les vapeurs d'iode donnent de bons résultats et la notion d'atonicité ne semble pas être une explication suffisante.

Des modifications ont été apportées à la composition de la solution primitive de GRAM. Ainsi M. NICOLLE (1875) préconise l'emploi de la solution iodo-iodurée ou « *liquide de GRAM fort* », dont la composition est la suivante :

Iode.	1 gr.
Iodure de potassium.	2 gr.
Eau.	100 cm ³

Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs (1927-1931-1932-1934) utilisent la solution de LUGOL proposée par GRAM.

NEIDE (1904), LASSEUR (1927) ont étudié l'influence de la solution iodo-iodurée sur la « *durée de décoloration* », sur la « *vitesse de décoloration* » des Bactéries. Ces Auteurs arrivent aux conclusions suivantes :

a) En prolongeant le temps de contact des préparations avec la solution iodée, on retarde la décoloration des plastides.

b) En augmentant la concentration de la solution iodo-iodurée en iode, on accroît la résistance des plastides bactériennes à la décoloration. « *Cet accroissement est surtout sensible chez les germes à lente décoloration. Avec les Bactéries de faible résistance « ne prenant pas le Gram », le retard à la décoloration est de l'ordre des erreurs expérimentales* » (Ph. LASSEUR, 1927).

c) Si on élève la température de la solution de LUGOL, on diminue la vitesse de décoloration et les préparations ainsi traitées restent colorées en violet-noir intense. NEIDE (1904) :

traite le Bacille de la septicémie hémorragique à chaud par la solution iodo-iodurée et le soumet à l'action de l'alcool absolu. Dans ces conditions d'expérience, ce Bacille n'est pas décoloré au bout de quatre jours.

d) La solution de LUGOL en vieillissant montre un affaiblissement de sa coloration brune et une perte des propriétés qui l'ont fait choisir par GRAM. Ainsi *B. tumescens* traité par une solution de Violet de gentiane et par une solution de LUGOL vieille de 7 mois, se décolore en 50 à 60 minutes sous l'action de l'alcool à 80, alors que, normalement, sa vitesse de décoloration est de 1 heure et demie (NEIDE, 1904). Ces faits montrent la nécessité absolue d'utiliser des solutions iodo-iodurées de préparation récente pour éviter toute cause d'erreur dans l'établissement des vitesses de décoloration. De même, cette solution doit être gardée dans un récipient bien bouché et à l'abri de la lumière.

ATKINS (1929), KOPELOFF (1922-1926) compensent l'effet de l'acidité de la solution d'iode par addition de soude. Ils dissolvent 2 gr. d'iode dans 10 cm³ d'une solution normale de soude auxquels ils ajoutent 90 cm³ d'eau. Ce procédé aurait, en outre, l'avantage de libérer des ions « *hydroxyl* » qui intensifieraient la coloration.

CHAPITRE VI

LE DÉCOLORANT

Nous avons vu que le temps de décoloration est fonction de la nature de la solution colorante et de sa stabilité, mais il est aussi sous la dépendance du décolorant. Cela me conduit à l'étude de ce dernier facteur.

Je rappelle que la division des Bactéries en deux groupes : celles qui « *prennent le GRAM* » et celle qui « *ne le prennent pas* » est arbitraire : tous les germes se décolorent, mais leur vitesse de décoloration est différente. Cette vitesse est fonction, non seulement de l'espèce bactérienne, mais aussi du décolorant utilisé.

GRAM (1884) décolorait ses préparations par l'alcool absolu et les éclaircissait ensuite à l'huile d'œillette. Il se servit aussi avec plus ou moins de succès, d'alcool additionné d'acide chlorhydrique ou azotique à 3 %.

Je vais résumer brièvement les tentatives effectuées par les différents auteurs dans la recherche du meilleur décolorant.

ALCOOL ÉTHYLIQUE

Après GRAM, seuls GRIMME (1904) et LOEFFLER (1906) utilisèrent l'alcool absolu.

Cet alcool fut remplacé par des alcools de différents degrés : alcool à 95 (LASSEUR, 1927), alcool à 80 (NEIDE), alcool à 70 (EISENBERG), etc.

NEIDE (1904) étudie la durée de décoloration de *B. tumescens* en fonction du titre de l'alcool. Le pouvoir décolorant du

mélange alcool et eau croît à mesure que le titre alcoolique diminue ; avec cette Bactérie, la durée de décoloration est maximum pour une concentration de 40 %, puis elle décroît très rapidement.

NEIDE accorde sa préférence à l'alcool à 80 qui a une action moins brutale que l'alcool à 60.

EISENBERG (1918) a obtenu, pendant la guerre, des résultats incertains en utilisant de l'alcool à 70 : des souches de *Staphylocoque* et de *Streptocoque* typiques devenaient « GRAM-négatives ».

LASSEUR et SCHMITT (1927) reprennent l'étude de la décoloration en fonction du titre de l'alcool : sur le Bacille typhique, le Bacille dysentérique, le Bacille pyocyanique, sur *B. chlororaphis*, sur *B. Le Monnier* et sur des germes sporogènes du groupe *B. subtilis*, *B. mesentericus*. Il résulte des expériences de ces auteurs que les germes sporogènes se décolorent plus rapidement dans l'alcool à 80 que dans l'alcool absolu. Avec les germes asporogènes, ils obtiennent un résultat exactement contraire.

Influence de la température de l'alcool. — La température de l'alcool exerce une influence non négligeable sur la vitesse de décoloration.

NEIDE (1904) remarque qu'en élevant de 18° C. à 28° C. la température de l'alcool, la durée de décoloration de *B. tumescens* passe de 7 heures 30 à 1 heure 20.

LASSEUR et SCHMITT (1927) signalent une influence analogue de la température du bain décolorant. Mais cette action varie suivant que l'on s'adresse à des germes « GRAM-positif » ou à des germes « GRAM-négatifs ». Avec *B. pyocyaneus*, *B. chlororaphis*, la vitesse de décoloration diminue avec la température de l'alcool. On observe un phénomène

inverse lorsqu'on expérimente avec *B. mesentericus* FRAENKEL ou *B. mesentericus fuscus* KRAAL (1).

ALCOOLS HOMOLOGUES

KISSKALT (1904) étudie l'action décolorante des alcools homologues de l'alcool méthylique. Leur activité décroît avec le rang de l'alcool, l'alcool méthylique étant l'alcool le plus actif.

Ces résultats sont confirmés par ceux de LASSEUR et SCHMITT (1927) pour qui l'emploi de l'alcool amylique diminue la vitesse de décoloration des germes asporogènes (Bacille typhique et Bacille dysentérique).

MÉLANGE ALCOOL-ACÉTONE

L'alcool-acétone est d'un usage courant dans les laboratoires, mais dans ce mélange on substitue en général l'alcool à 95 à l'alcool absolu préconisé par M. NICOLLE (1895).

M. NICOLLE utilisait un mélange d'alcool absolu et d'acétone en proportions variables suivant le matériel à décolorer : acétone au 1/3 pour les frottis, et au 1/5 pour les coupes.

Pour M. NICOLLE, l'alcool-acétone a l'avantage de décolorer plus rapidement les Bactéries que l'alcool absolu, et de ne pas noircir les préparations que l'on veut conserver.

LASSEUR et SCHMITT (1927) montrent que le pouvoir décolorant du mélange alcool-acétone varie avec le matériel bactérien utilisé. C'est ainsi que l'alcool-acétone décolore les germes « GRAM-négatifs » plus rapidement que l'alcool absolu ou que l'alcool à 80. Par contre, sur les Bactéries sporogènes, le mélange alcool-acétone a une action moins énergique que l'al-

(1) Toutes ces expériences ont été effectuées avec de l'alcool à 80.

cool à 80. Dans les expériences de LASSEUR (1927) l'alcool-acétone a un pouvoir décolorant intermédiaire entre celui de l'alcool absolu et celui de l'alcool additionné d'acide. Mais il est « incapable de déceler des différences sensibles entre les diverses espèces bactériennes expérimentées, tandis que l'alcool à 80 sépare les Bacilles dysentériques des germes fluorescents et rapproche *B. Le Monnieri* de *B. pyocyaneus* » (LASSEUR et SCHMITT, 1927).

Dans les expériences de KOPELOFF et COHEN (1922) l'acétone s'est révélée comme un décolorant trop énergique, même pour les germes « GRAM-positifs ».

Cela s'explique par ce fait que les auteurs américains se servent en général des solutions colorantes d'un pouvoir tinctorial beaucoup plus faible que celles utilisées en France. Aussi, après de nombreux essais, KOPELOFF et COHEN utilisent-ils comme décolorant un mélange à parties égales d'alcool et d'acétone.

Cependant, certains auteurs accordent leur préférence à l'acétone. Ainsi pour M.-W. LYON (1920), l'acétone donnerait une décoloration plus rapide et plus constante que celle observée avec l'alcool. BURKE (1922) va plus loin : il accorde à l'acétone un nouvel avantage : celui de décolorer plus rapidement les Bactéries « GRAM-négatives » et plus lentement les Bactéries « GRAM-positives » que l'alcool absolu.

ALCOOLS ADDITIONNÉS D'ACIDES

GRAM (1884) et après lui GUNTHER (1898) utilisent de l'alcool additionné d'acides : acide chlorhydrique, acide azotique, acide sulfurique, acide lactique, dans la proportion de 2 à 3 % d'acide.

Avec ces mélanges, la décoloration est brutale et risque de détruire le matériel bactérien.

LASSEUR et SCHMITT (1927) essaient d'obtenir des vitesses

de décoloration différentes suivant les germes considérés, en utilisant simplement des solutions aqueuses d'acides : acide acétique à 5 % ; acide chlorhydrique à 10 %. Il ressort de ces expériences que la vitesse de décoloration de *B. Le Monnieri* est plus petite que celles des autres Bactéries fluorescentes et que *B. mesentericus* (souche LEHMANN) peut être facilement différencié des autres germes du groupe *subtilis-mesentericus* par sa vitesse de décoloration dans l'alcool chlorhydrique.

SOLUTIONS SALINES

G. COUDRAY (1929) essaie de déterminer les vitesses de décoloration de certains germes par l'emploi de solutions salines.

Les solutions salines ont une action décolorante certaine, mais difficile à mettre en évidence : « *Il faut pour cela choisir certains germes, certains sels, colorer longtemps et à haute température.* »

SOLUTIONS SAVONNEUSES

M. BEGUET remplace l'alcool par une solution savonneuse à 1 %, c'est-à-dire par un liquide miscible à l'eau et possédant une tension superficielle assez basse.

CHAPITRE VII

COLORATION DE CONTRASTE

La décoloration des plastides bactériennes sous l'action de l'alcool s'effectue suivant une série de stades. On obtient toute la gamme de teintes intermédiaires du violet-noir intense au terme incolore. Deux difficultés surgissent immédiatement : au début, il semble bien y avoir une proportionnalité entre le temps d'action de l'alcool et la décoloration. On atteint rapidement le stade gris-bleu mais pour arriver à la décoloration totale, il est nécessaire de faire agir l'alcool pendant un temps très long. De plus, il est très difficile de décider si une plastide est encore colorée en gris-sale ou complètement décolorée. Le facteur personnel joue un rôle énorme dans l'interprétation de la fin de la réaction. Cependant, pour éviter tout risque d'erreurs dues au phénomène de déplacement par la coloration de contraste, NEIDE (1904) indique la teinte qu'il considère comme correspondant au stade de décoloration. Ph. LASSEUR (1927) propose une teinte plus pâle que celle de NEIDE : une teinte gris-clair violacée, teinte voisine de la coloration 503 A. du code des couleurs, mais plus faible. DELETANG (1933) adopte ce test.

Mais l'examen microscopique de préparations faiblement colorées est toujours très pénible. Pour cette raison, de nombreux auteurs ont préconisé l'emploi d'une solution colorante de contraste. Divers colorants ont été proposés :

La Vésuvine ou le Brun Bismarck en solution aqueuse à 1 % (GRAM, 1884; KISSKALT, 1904).

La Fuchsine basique ou solution de ZIEHL diluée au 1/50° (BEGUET, 1929).

L'Eosine et la Fuchsine diluées (M. NICOLLE, 1895).

La Safranine en solution aqueuse à 3 % (R. et W. ALBERT, 1901); ou en solution aqueuse à 2 % (BURKE, 1922).

Le Rouge neutre en milieu acétique (LUTZ, 1929).

La Fuchsine basique en solution aqueuse à 0.031 0/00 (Ph. LASSEUR et SCHMITT, 1927; Ph. LASSEUR, A. DUPAIX, C. MAGUITOT, 1931); en solution aqueuse à 0.1 % (KOPELOFF, 1922).

Dans un but de simplification, MÉRIEUX (1895) ajoutait à la solution iodo-iodurée une solution saturée d'éosine à l'eau dans l'alcool. Cette méthode, si elle a l'avantage d'être rapide, n'est pas à recommander. La décoloration qui s'effectue après le mordantage ne respecte sûrement pas la coloration de contraste.

Mais la double coloration peut être cause d'erreur. HOGGE (1893) a signalé le danger des fortes concentrations de la solution de contraste qui peut masquer la première coloration dans la méthode de GRAM. On observe en effet le phénomène du déplacement d'un colorant par l'autre. KOPELOFF et COHEN (1928) signalent ce phénomène de déplacement et la « *sur-coloration* ». Dans ce dernier cas, les plastides bactériennes ne sont plus d'un beau violet-noir ou d'un rouge franc, mais d'une teinte rouge violacée.

Ph. LASSEUR (1927) vérifie ces faits sur *Staphylococcus aureus*, en utilisant des solutions aqueuses de Fuchsine basique à différentes concentrations: solutions à 0.5 — à 0.125 — à 0.625 — à 0.03125 gr. par litre. Seule, la solution de Fuchsine à 0.031 gr. 0/00 donne un nombre de plastides colorées en violet-noir égal à celui obtenu en l'absence de coloration de contraste. Dans les deux cas, 95 % des plastides de *Staphylococcus aureus* restent colorées en violet-noir, tandis qu'avec la solution de Fuchsine à 0 gr. 5 %, 100 % des plastides prennent la coloration de contraste, mais offrent des teintes d'intensité différente qui vont du rouge foncé au rouge clair.

On obtient la *résultante rouge violacée* signalée par GISCART (1923).

KOPELOFF et COHEN (1923) fixent à 20 secondes le temps d'action d'une solution de Fuchsine basique à 0 gr. 1 %. Pour ces auteurs, une application plus longue risquerait de rendre les germes « GRAM-négatifs » ou « GRAM-douteux ».

La technique de KOPELOFF et COHEN est à déconseiller, car 20 secondes est un temps trop court pour la coloration des Bactéries. Il est préférable d'utiliser une concentration 3 fois plus faible, avec un temps d'action plus long. Dans le cas de solutions de faible concentration, on n'a pas à craindre le phénomène de déplacement d'un colorant par un autre, dû à un temps mal déterminé.

En résumé, la double coloration effectuée sans précaution est une cause d'erreurs. Mais il est possible de supprimer ces dernières de la façon suivante :

a) en utilisant des solutions de Fuchsine basique de faible concentration (0 gr. 031 0/00), pendant un temps d'action assez court (1 minute).

b) en lavant très soigneusement les préparations après action du décolorant et de la solution de contraste.

Dans ce cas, l'emploi de la solution de contraste a le gros avantage de mettre en évidence certains éléments anatomiques qui ne restent pas colorés en violet-noir, et de faciliter les numérations.

CHAPITRE VIII

MODIFICATIONS A LA TECHNIQUE DE LA COLORATION DE GRAM

Dans un but de perfectionnement ou de généralisation, de nombreuses modifications ont été apportées au protocole indiqué par GRAM (1884). Ces changements ont porté, soit sur la technique, soit sur le colorant ou le décolorant, soit sur la substitution à la solution iodo-iodurée de solutions de composition différente.

L'étude détaillée des modifications antérieures à 1929, sortant du cadre de cette étude, je signalerai simplement les travaux de WEIGERT (1897), de LOEFFLER (1906), de NICOLLE (1895), de GIACOMI (1885), de LUTZGARTEN (1886), de GOTSTEIN (1885), de G. COUDRAY (1929) (1).

Pendant ces dernières années, la coloration de GRAM a été l'objet de nombreux travaux en Amérique. Pour bien comprendre les recherches effectuées par les savants américains, il ne faut pas oublier que la coloration de GRAM ne semble pas leur avoir donné des résultats bien satisfaisants. Il est de notion courant, pour ces savants, que les Bactéries peuvent se comporter de trois façons différentes, d'où la classification des germes en « GRAM-positifs » en « GRAM-négatifs » et en « GRAM-variables » ou « GRAM-douteux », suivant les auteurs. Après ce que nous venons de dire sur la notion de *durée*

(1) Pour l'étude de ces auteurs, je renvoie le Lecteur à la thèse faite au Laboratoire de Microbiologie par mon camarade G. COUDRAY (1929).

de décoloration ou vitesse de décoloration, la façon d'exprimer les résultats adoptée par les savants américains ne nous surprend pas : on pourrait, en effet, tout aussi logiquement faire le groupe des Bactéries qui se décolorent en 30'', en 40'', etc....

Ces remarques de principe étant faites, voyons en quoi et comment les Américains ont contribué au perfectionnement de la coloration de GRAM.

Des nombreuses modifications proposées à la technique de GRAM, trois méthodes seulement doivent être retenues : celles de ATKINS (1920), de BURKE (1922), de KOPELOFF (1923).

BURKE (1920-1926) traite les préparations par une solution aqueuse de Violet de gentiane additionnée d'une solution de bicarbonate de soude à 5 %. L'auteur utilise la solution d'iode suivante.

Iode.	1 gr.
Iodure de potassium.....	2 gr.
Eau.	100 cm ³

L'emploi d'acétone comme décolorant donne à ce savant de meilleurs résultats que le mélange de 3 parties d'acétone pour 1 partie d'éther. La coloration de contraste est obtenue au moyen d'une solution aqueuse de Safranine à 2 %.

ATKINS (1920) remplace l'eau d'aniline par du sulfate d'aniline dans la solution colorante pour en augmenter la stabilité. Il utilise la solution d'iode forte à laquelle il ajoute de la soude.

KOPELOFF et BEERMANN (1923) combinent les principaux facteurs des techniques de BURKE et de ATKINS. KOPELOFF et BEERMANN mélangent directement à la solution colorante de Violet de méthyle 6 B. la solution de bicarbonate de soude, dans la proportion de 30 gouttes de la première solution pour 8 gouttes de la seconde. Ils utilisent une solution d'iode alcaline et l'acétone pur comme décolorant.

KOPELOFF et BEERMANN identifient facilement par cette méthode le Gonocoque et le Bacille diphtérique. Le Lecteur français sait combien le comportement du Gonocoque à la méthode de GRAM a suscité de nombreuses discussions : pour certains auteurs, le Gonocoque « *prend le GRAM* », tandis que pour d'autres il « *ne le prend pas* ». Mais il n'en est pas de même pour le Bacille diphtérique qui est donné, par tous les auteurs, comme « *GRAM-positif* ».

L'acétone est un décolorant très énergique et il n'est pas étonnant que KOPELOFF et COHEN (1928) aient cherché à diminuer son action en utilisant le mélange alcool-acétone. La coloration de contraste est obtenue par action d'une solution de Fuchsine basique à 0 gr. 1 % pendant 20 secondes.

Nous avons vu les réserves qu'il fallait faire pour la solution de contraste telle que l'emploient KOPELOFF et COHEN.

En résumé, la méthode de KOPELOFF est la suivante :

- a) Faire agir pendant 5 minutes la solution colorante de Violet de gentiane.
- b) Traiter pendant 2 minutes par la solution d'iode alcaline.
- c) Décolorer pendant 30 secondes à l'alcool acétone.
- d) Laver.
- e) Colorer pendant 20 secondes à la solution de Fuchsine basique à 0 gr. 1 %.
- f) Laver et sécher les préparations.

TECHNIQUE PERSONNELLE

Dans mes expériences sur la coloration de GRAM, j'ai utilisé, au moins dans ses grandes lignes, la méthode proposée par Ph. LASSEUR (1927). Dans ce chapitre, j'indique la technique générale que j'ai suivie ; certaines modifications seront envisagées au fur et à mesure de l'expérimentation.

MILIEUX UTILISÉS

Les Bactéries sont cultivées sur gélose peptone répartie en boîtes de ROUX ou en tubes inclinés. La gélose peptone est ajustée à $\text{pH} = 7$ (méthode électrométrique).

VERRERIE

Les lames porte-objets sont traitées à chaud par le mélange sulfochromique. Elles sont soumises ensuite à un lavage prolongé dans l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage ait un pH voisin de $\text{pH} = 6$ (méthode électrométrique).

SUSPENSION MICROBIENNE

Les corps microbiens sont mis en suspension et lavés 3 fois à l'eau distillée. Après agitation modérée des corps microbiens avec des billes de verre, et centrifugation fractionnée, on obtient une suspension homogène. Par dilution convenable, on amène cette suspension à une concentration voisine de 40 milliards de germes au cm^3 .

ETALEMENT

Des gouttes de suspension bactérienne sont déposées sur les lames porte-objets au moyen d'une pipette effilée. Ces gouttes sont étalées très soigneusement avec un fil de platine. En effet, il est nécessaire d'obtenir un étalement aussi mince que possible, pour éviter les erreurs dues à la présence d'amas de plastides.

Pour assurer une adhérence suffisante des plastides au verre, après étalement, les lames sont laissées au repos pendant

12 heures à la température du laboratoire. Durant ce laps de temps, les préparations sont préservées des poussières de l'air.

Les étalements sont fixés par chauffage de 2 minutes à la température de 112° C. au moyen d'une platine chauffante.

COLORANT

Les solutions colorantes utilisées sont des solutions de Violet de gentiane phéniquées et stabilisées par application du phénomène de BOUTARIC (Procédé Ph. LASSEUR, A. DUPAIX, C. MAGUITOT, 1931). La préparation de telles solutions a été l'objet d'une étude particulière (Chapitre IV).

J'exprime le pouvoir tinctorial de ces solutions en disant qu'après X minutes d'action de l'alcool à 95, Y % des plas-tides de *Staphylococcus aureus* restent colorées en violet-noir.

SOLUTION DE LUGOL

La solution de LUGOL est toujours de préparation récente. Sa composition est la suivante :

Iode.	1 gr.
Iodure de potassium.	2 gr.
Eau distillée.	300 cm ³

DÉCOLORANT

Le décolorant utilisé est l'alcool à 95. L'alcool est renouvelé dans les vases BORREL à chaque changement de préparation.

COLORATION DE CONTRASTE

La coloration de contraste est obtenue au moyen d'une solution aqueuse de Fuchsine basique à 0 gr. 031 0/00.

NUMÉRATIONS

Les numérations sont effectuées à l'aide d'un oculaire divisé en quatre carrés, oculaire analogue à ceux employés dans la numération des globules rouges.

Pour éviter les erreurs dues, soit aux phénomènes de capillarité, soit à la tension superficielle lors de l'étalement, les numérations sont faites dans la partie centrale de la préparation.

Les nombre donnés dans les tableaux sont la moyenne de plusieurs essais car, *« dans l'atténuation des erreurs fortuites, les moyennes ont une importance beaucoup plus grande en Biologie que dans les Sciences Naturelles »* (Ph. LASSEUR, 1927).

PROTOCOLE DES EXPÉRIENCES

Au moment de leur utilisation, les différentes solutions colorantes ou décolorantes sont distribuées chacune dans une série de 8 vases BORREL.

Un dispositif permettant l'immersion et l'agitation simultanée des préparations est constitué ainsi: une planchette de bois sert de support à 16 pinces fixées par groupes de 2. Chaque pince maintient 2 lames accolées par leur surface libre. Ce dispositif permet donc de colorer en même temps 36 préparations et d'obtenir des résultats vraiment comparables.

Les temps de contact des lames avec les solutions colorantes sont chronométrés d'une façon précise.

Au sortir de chaque bain colorant, les lames sont égouttées sur papier filtre de façon à faire absorber par celui-ci, en quelques secondes, l'excès de colorant. Après un premier lavage à l'eau distillée, la partie des lames porte-objets non recouverte du matériel bactérien est essuyée très soigneusement pour enlever toute trace de solution de LUGOL ou de colorant, encore

adhérente au verre. Il faut cependant éviter une dessiccation complète des préparations afin d'assurer un meilleur mouillage de la solution de contraste.

Bien que les solutions colorantes paraissent rigoureusement linipides, elles sont toujours filtrées avant et après chaque coloration (1).

Les solutions colorantes ont été utilisées pendant un an.

Dans mes recherches, j'ai adopté le protocole suivant :

1° Les préparations fixées sont laissées durant 2 minutes en contact avec la solution hydro-alcoolique de Violet de gentiane phéniquée stabilisée.

Afin d'obtenir un mouillage uniforme des préparations par la solution colorante, les lames sont agitées, pendant 15 secondes, dans le bain colorant.

2° Les préparations sont soumises à l'action de la solution iodo-iodurée durant 2 minutes.

On sait qu'au contact de la solution de LUGOL, les solutions colorantes donnent un précipité. Afin d'éviter un empatement des préparations et la formation d'un précipité gênant, j'opère de la façon suivante :

a) les lames sont plongées durant 15 secondes dans un premier bain de solution de LUGOL où elles sont agitées.

b) puis elles sont transportées rapidement dans une deuxième solution de LUGOL. Il est nécessaire de « *neutraliser* » le temps qui s'écoule entre les deux immersions.

3° Les préparations sont soumises à l'action décolorante de l'alcool à 95 pendant un temps déterminé.

Dès leur introduction dans l'alcool, les préparations sont agitées pendant 2 minutes à la cadence d'un mouvement de va et vient par seconde, puis durant 15 secondes toutes les

(1) L'introduction des préparations dans les solutions colorantes peut déterminer un très faible précipité.

dix minutes, quel que soit le temps d'action du liquide décol-
lorant.

4° Les préparations sont lavées dans l'eau distillée. A cet
effet, elles sont agitées durant 2 minutes dans l'eau distillée.

5° Le temps de contact des préparations avec la solution de
contraste est de 1 minute.

6° Les lames sont lavées à nouveau dans l'eau distillée du-
rant 2 minutes.

7° Enfin, les préparations, séchées, sont examinées avec un
objectif à immersion apochromatique et avec une lumière aussi
homogène que possible.

En résumé, la technique utilisée pour la coloration de GRAM
est la suivante :

- | | |
|--|----------------|
| 1° Action de la solution colorante..... | 2 minutes |
| 2° Action de la solution de LUGOL..... | 2 minutes |
| 3° Action de l'alcool avec agitation régulière. | Temps variable |
| 4° Agitation des préparations dans l'eau dis-
tillée. | 2 minutes |
| 5° Action de la solution de contraste..... | 1 minute |
| 6° Agitation des préparations dans l'eau
distillée. | 2 minutes |
-

CHAPITRE IX

INFLUENCE DE L'ÂGE DE LA CULTURE

La coloration de GRAM est sous la dépendance de plusieurs facteurs d'action : les uns ont trait aux réactifs employés, les autres au matériel bactérien.

Nous venons d'étudier les premiers, nous allons rapidement envisager maintenant l'influence de l'âge de la culture.

CZAPLEWSKI (1895) constate que des cultures jeunes de *Bacille diphtérique* se décolorent plus difficilement que les cultures âgées du même germe.

GRIMME (1902) observe des faits analogues. A propos de *B. tumescens*, cet auteur remarque que, suivant les stades de leur évolution, les Bacilles sporulés peuvent se comporter de façon différente vis-à-vis de la méthode de GRAM : en colorant comparativement des spores, des bâtonnets germinatifs, des bâtonnets au repos et des sporanges, on constate que la matière colorante est fixée en quantité décroissante dans l'ordre suivant : spores, bâtonnets germinatifs, bâtonnets au repos et sporanges. Dans ce dernier cas, ainsi qu'il fallait s'y attendre, les ébauches de spores conservent la coloration avec une grande énergie.

Pour NEIDE (1904) *B. tumescens* en culture de huit à dix jours est décoloré par l'alcool à 80 en 30 minutes, tandis qu'en culture de 18 heures sa durée de décoloration est de 1 heure 15 minutes. Les Bactéries sporogènes n'offrent pas la même résistance à l'alcool à leurs différents stades d'évolution. Pour

obtenir des résultats comparables, NEIDE donne la préférence aux bâtonnets présentant l'ébauche de spores.

LASSEUR et SCHMITT (1927) étudient l'influence de l'âge de la culture sur la vitesse de décoloration avec des germes sporogènes: *B. mesentericus fuscus*, *B. mesentericus niger*, *B. subtilis*. Toutes les plastides d'une même culture de ces Bactéries n'offrent pas la même résistance à l'action décolorante de l'alcool à 80. Après un séjour de 2 minutes dans l'alcool, 5 % des plastides sont décolorées, tandis que 70 % des éléments bactériens ne sont décolorés qu'après 40 minutes. Avec *B. mesentericus niger*, les vitesses de décoloration sont de 40 minutes en culture de 24 heures et de 50 minutes en culture de 48 heures. *B. mesentericus fuscus* se décolore en 70 minutes dans le premier cas et en 80 minutes dans le second.

Les résultats de LASSEUR et SCHMITT confirment donc les recherches de CZAPLEWSKI, de NEIDE.

Nous venons de voir que les germes sporogènes se comportent différemment suivant qu'on considère les Bactéries à telle ou telle phase de leur cycle d'évolution. Les Bactéries asporogènes n'offrent pas un cycle aussi compliqué, mais elles présentent néanmoins une série de phases successives bien mise en évidence par LASSEUR. Malgré leur simplicité apparente, LASSEUR considère les plastides bactériennes comme étant très compliquées. On sait que les Biologistes établissent une relation étroite entre la composition chimique du cytoplasme et la forme de la cellule. Les plastides bactériennes semblent ne pas présenter de modifications morphologiques appréciables, cependant il existe des variations physico-chimiques importantes du cytoplasme et de la membrane, car « *tout ce qui vit change par cela même qu'il vit* » (LE DANTEC).

Il y a pour chaque espèce « *un stade où la vitesse de décoloration atteint son maximum. C'est en général au moment où le cytoplasme n'offre aucune différenciation et paraît homo-*

gène ainsi que cela s'observe avec les plastides très jeunes. Mais comme chaque espèce parcourt son cycle avec une vitesse déterminée (pour des conditions données), il résulte que le stade de durée maximum correspond à des cultures dont l'âge varie avec l'espèce expérimentée » (Ph. LASSEUR et SCHMITT, 1927).

DELÉTANG (1933) observe des faits analogues avec la Bactérie charbonneuse et avec *B. mesentericus ruber*.

Dans le Tableau II sont indiqués les temps d'action de l'alcool nécessaires pour obtenir la décoloration totale de ces germes (d'après DELÉTANG, 1933).

TABLEAU II

Temps de décoloration de la Bactéridie charbonneuse
et de *B. mesentericus ruber*

	Culture de :	
	24 heures	48 heures
<i>B. mesentericus ruber</i> ..	2 heures 15'	1 heure 10'
Bactérie charbonneuse ..	5 heures	2 heures

Pour KOPELOFF et COHEN (1928) *Micrococcus zymogenes* (souche M.-C. KAHN) et *Lactobacillus acidophilus* HOLLAND offrent une décoloration plus longue en culture de 24 heures, qu'en culture de 48 heures.

Après avoir constaté la diminution de la colorabilité des vieilles cultures de *Staphylococcus aureus*, BURKE (1922) essaie d'interpréter le phénomène. Pour le savant américain, l'augmentation de la vitesse de décoloration ne serait pas due uniquement à l'autolyse ou à l'altération de la paroi de la cellule, mais surtout à la présence d'un acide.

L'ensemble des recherches que nous venons d'analyser établissent un fait indiscutable: les Bactéries offrent des vitesses de décoloration différentes suivant que l'on s'adresse à des plastides provenant de cultures jeunes (12 à 24 heures) ou de cultures âgées (n. jours).

Je vais analyser maintenant un ensemble de travaux dans lesquels les auteurs ont utilisé des plastides beaucoup plus jeunes que celles employées par CZAPLEWSKI, GRIMME, NEIDE, etc...

ZIRONI (1920), SOLARINO (1930), T. CASTELLI (1933) étudient l'influence de l'âge des Bactéries ou des Blastomycètes sur leur vitesse de décoloration dans la méthode de GRAM. Ces savants italiens constatent qu'en cultures très jeunes « *de peu d'heures* », les plastides se décolorent plus rapidement qu'aux stades plus avancés de leur développement. Ils paraissent surtout s'inspirer des travaux de KRYLOW sur le Bacille tuberculeux.

Pour KRYLOW, en effet, le Bacille tuberculeux, en culture jeune, est « *GRAM-négatif* »; à un stade ultérieur de son développement, il devient « *GRAM-positif* »; c'est seulement plus tard qu'il acquiert la propriété d'être acido-résistant.

ZIRONI, à qui nous sommes redevables de si belles recherches bactériologiques, a voulu vérifier si les faits observés avec le Bacille tuberculeux se retrouvaient avec: *B. anthracis*, *B. mesentericus*, *B. subtilis*, le Bacille diphtérique, différents *Cocci*, etc.

Tout d'abord, ZIRONI constate qu'en culture de 24 heures, les plastides du Bacille du Charbon, en majorité sporulées, résistent entièrement à la décoloration dans la méthode de GRAM et que les plastides « *ne prenant pas le GRAM* » sont beaucoup plus nombreuses dans les vieilles cultures que dans les cultures de 24 heures.

L'aspect morphologique des plastides est différent: les plastides « *GRAM-positives* » sont d'un diamètre plus étroit que

les plastides « GRAM-négatives ». Dans les chaînes de plusieurs éléments, les plastides terminales et même certaines cellules intercalées dans la chaîne peuvent avoir pris la coloration de contraste. Dans certains cas, les éléments bactériens peuvent présenter les deux aspects suivants : une partie de la plastide (la plus grosse) aurait conservé la coloration de GRAM tandis que l'autre partie (la plus mince) serait « GRAM-négative » ; dans des plastides ayant pris la coloration de contraste on remarque néanmoins des grains violet-noir de forme et de taille différentes, disséminés sur toute la surface des germes.

Pour ZIRONI, l'étude du comportement des spores germinantes et des cultures jeunes à la coloration de GRAM offre un intérêt particulier : à l'état de repos, les spores du Bacille du Charbon ne se colorent pas par la méthode de GRAM, exception faite pour la capsule qui se teinte en violet-noir. Au début de la germination, les spores se gonflent et à ce stade, elles se colorent faiblement en rose. « Elles prennent une légère coloration « GRAM-négative ». La spore continue à augmenter de volume et devient « GRAM-positive ». A ce stade, la spore donne naissance à un bâtonnet germinatif (1) « GRAM-négatif » qui croît et atteint la taille d'une plastide adulte du Bacille du charbon. A ce stade de l'évolution de la Bactérie, la plastide est devenue « GRAM-positive ».

On sait que si les Bactéries sporogènes se reproduisent par spores, elles peuvent aussi « se multiplier par division ». On conçoit que ZIRONI ait cherché à vérifier si les faits observés avec des bâtonnets germinatifs pouvaient se retrouver avec des plastides jeunes obtenues par division. A cet effet, le savant italien a étudié des cultures jeunes de *B. anthracis*. Dans ces conditions d'expériences, ZIRONI observe des chaînes de plusieurs éléments qui n'ont pas pris la coloration

(1) Germination polaire.

de GRAM, ou des plastides dont « une partie (la plus grosse) est « GRAM-positive »; dans ce dernier cas, la partie mince est « GRAM-négative » et la limite entre les deux zones de coloration est souvent très nette. »

B. mesentericus et *B. subtilis* se comporteraient d'une façon identique à celle de *B. anthracis*.

Dans les expériences effectuées avec ces Bactéries, ZIRONI a recours à un artifice et il fait plusieurs passages par jour (jusqu'à deux ou trois dans la journée), afin de maintenir les germes dans des conditions de développement plus intense. Théoriquement, il est possible d'entraîner les germes à se développer rapidement en effectuant des passages répétés sur milieu nutritif convenable. Mais il ne faut pas sous-estimer l'observation de GOTSCHLICH. Ce savant a montré que le transport des Bactéries sur un milieu neuf détermine une mort en masse suivie d'une multiplication intense des éléments ayant résisté à l'action du nouveau milieu. ZIRONI obtient d'ailleurs une très forte diminution de la sporogenèse. De plus, Ph. LASSEUR, J.-G. MARCHAL, A. DUPAIX (1931), J.-G. MARCHAL (1932), A. DUPAIX (1933) (1) se sont efforcés d'obtenir des colonies à partir d'une seule plastide, ce qui les oblige à suivre au microscope le comportement d'un élément bactérien ensemencé sur milieu solide. Or, ces auteurs ont remarqué qu'un grand nombre de plastides ensemencées ne se développent pas. Il est donc possible que les examens de ZIRONI aient porté non seulement sur des Bactéries en voie de division mais aussi sur des plastides mortes.

Quoiqu'il en soit de ces remarques, les recherches de ZIRONI montrent que, dans ses conditions d'expériences :

a) Les spores du Bacille du charbon émettent « un prolongement » « GRAM-négatif » qui s'allonge jusqu'à atteindre les

(1) Voir thèse A. DUPAIX : Etude morphologique et biologique de *B. caryocyanus* BEIJERINCK-DUPAIX, 1930. LE FRANÇOIS, Paris, 1933.

dimensions d'un bacille type du charbon duquel il se différencie par des dimensions transversales plus petites » ;

b) Les espèces microbiennes « GRAM-positives » examinées (Bacille du charbon, *B. mesentericus*, *B. subtilis*, Bacille tuberculeux) se présentent « GRAM-négatives » à un stade initial de leur développement (*stadi initiali di sviluppo*), puis, à un stade ultérieur, la plastide reste colorée en violet-noir.

Très bien conduites, les expériences de ZIRONI paraissent entraîner la conviction. Il n'y a donc rien d'étonnant à ce que SOLARINO (1930) se soit efforcé de vérifier les conclusions de ZIRONI en étudiant différentes souches de *B. mesentericus niger*, *B. mesentericus vulgatus*, *B. mesentericus fuscus* et *B. subtilis*.

SOLARINO a fait porter son examen sur des cultures d'âge différent. Utilisant l'artifice suggéré par ZIRONI, SOLARINO réussit facilement à obtenir les stades initiaux de développement de ces germes par passages répétés et en série sur milieu solide. Il obtient ainsi des cultures de quelques heures (2 à 3). Mais le savant italien prend certaines précautions pour éviter, en partie du moins, la cause d'erreur possible que j'ai signalée à propos des belles recherches de ZIRONI: il fait porter son examen, non sur le fragment de voile qui a servi à l'ensemencement, mais sur les germes en voie de division. En culture de quelques heures (2 à 3 heures) les plastides de *B. mesentericus* ne gardent pas la coloration de GRAM, et des pôles des spores partent des prolongements (« bâtonnets germinatifs »), en tronc de cône, « GRAM-négatifs ». Ces prolongements atteignent les dimensions d'une plastide adulte de *B. mesentericus*.

Au moment où les bâtonnets germinatifs se sont détachés des membranes vides de leur spore, ces dernières, par peptisation, ont complètement disparu. J'insiste sur cette absence de la membrane de la spore dont l'importance est capitale pour établir la filiation entre la spore et la plastide bactérienne.

Sous cette réserve, nous constatons que les plastides ne se colorent pas encore en violet-noir. Au bout d'un certain temps, elles acquièrent la propriété de se colorer par la méthode de GRAM. Cette propriété nouvelle n'est pas durable, et à mesure que la plastide bactérienne vieillit, elle perd la faculté de se colorer par la méthode de GRAM.

B. subtilis a le même cycle de développement que *B. mesentericus* et ces deux Bactéries se comportent dans les essais de SOLARINO comme le Bacille du charbon dans les expériences de ZIRONI.

Dans une intéressante étude sur la méthode de GRAM, CASTELLI (1932) retrouve des faits analogues à ceux décrits par ZIRONI (1922) et par SOLARINO (1930). T. CASTELLI expérimente sur des Blastomycètes appartenant à l'espèce *Torula lactis* (DOMBROWSKY). Il observe la présence simultanée de cellules « GRAM-positives » et « GRAM-négatives » chez les Champignons étudiés, et une diminution de la résistance à la décoloration dans les tous premiers stades du développement.

RÉCHERCHES PERSONNELLES

TECHNIQUE

CHOIX DU MATÉRIEL BACTÉRIEN

Mes expériences ont porté sur *B. mesentericus niger* (souche COURMONT, ROCHAIX) et sur *B. subtilis* (souche LASSEUR, THIRY).

Pour obtenir une quantité de spores suffisante, les cultures ont été faites sur pommes de terre glycélinées. Après plusieurs mois de culture (neuf mois pour *B. mesentericus niger*, et douze pour *B. subtilis*) l'examen microscopique ne décèle plus que des formes de résistance et très peu d'organismes végétatifs.

MISE EN SUSPENSION DES SPORES

Les spores sont mises en suspension à l'aide d'un jet violent d'eau distillée stérile. Puis, les corps microbiens sont soumis à trois lavages successifs (1).

Les spores se sédimentant facilement, on procède à une centrifugation fractionnée après le dernier lavage. Les plastides bactériennes qui ont persisté dans le milieu de culture sont restées en suspension dans le liquide surnageant. Ce dernier culot de centrifugation est remis en suspension dans un peu d'eau de façon à obtenir un liquide extrêmement trouble.

La durée de l'ensemble de ces manipulations ne dépasse pas une demi-heure et elles sont effectuées à des températures assez basses pour éviter tout début de germination. Puis, pour la même raison, les spores sont conservées dans l'eau à une température aussi basse que possible.

Toutes les suspensions qui devaient être utilisées pour l'étude des bâtonnets germinatifs étaient au préalable soumises à un examen microscopique afin de s'assurer que toutes les formes végétatives ont disparu.

ENSEMENCEMENT

La purée de corps microbiens est répartie à raison d'une à deux gouttes, dans une série de petits tubes, *a*, *b*, *c*, *d*, renfermant 1 cm³ de bouillon peptoné. Ces tubes sont portés à l'étuve à 37° C.

EXAMEN DES CULTURES

Les cultures sont examinées après des temps de contact de 3 heures, 3 heures et demie, 4 heures, 4 heures et demie,

(1) A l'eau distillée stérile.

5 heures, 6 heures. Une goutte du liquide est déposée sur une lame porte-objet et par simple inclinaison on laisse la goutte s'étaler. Il faut éviter de séparer, par action mécanique (1) les bâtonnets germinatifs de la membrane vide de la spore : celle-ci, en effet, n'adhère souvent que très faiblement à l'extrémité du bâtonnet germinatif.

MENSURATION

La mensuration des plastides bactériennes est effectuée au moyen de la grande chambre claire de ZEISS et du micromètre objectif.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

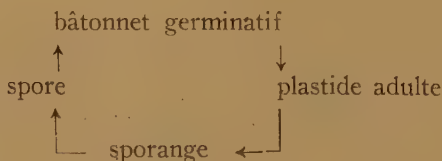
A. — Expériences effectuées sur *B. mesentericus niger* (SOUCHE COURMONT, ROCHAIX)

Examinons tout d'abord les résultats obtenus avec *B. mesentericus niger* (souche COURMONT, ROCHAIX), (Pl. I).

I. — ETUDE DE LA SPORULATION

Avant d'aborder l'étude des bâtonnets germinatifs, envisageons la formation de la spore, chez *B. mesentericus niger* et sa colorabilité dans le sporange.

La spore fait partie du cycle évolutif des Bactéries sporogènes, cycle que Ph. LASSEUR (1911) schématise de la façon suivante :



(1) Etalement au moyen d'un fil de platine, ou d'une lamelle couvre-objet.

La spore, à l'état libre, est limitée par une membrane. La structure de cette membrane a suscité de nombreuses recherches dont les résultats sont schématisés dans le Tableau III (in. Ph. LASSEUR et P. VERNIER, 1933).

TABLEAU III

Structure de la membrane des spores

Désignation des Bactéries	Structure de la membrane de la spore	Auteurs
<i>B. laticola.</i>	Intine et exine dans certains cas.	NEIDE (1904).
<i>B. robur.</i>	Intine et exine.	NEIDE (1904).
<i>B. granulosis.</i>	Endospore et ectospore.	MÜHLSCHLEGEL (1900).
<i>B. petrosclini.</i>	Endospore et ectospore.	BURCHARD.
<i>B. asterosporus.</i>	Intine et exine.	A. MEYER (1912).
<i>B. anthracis.</i>	Endospore et ectospore.	NAKANISHI (1901)

La membrane de la spore serait composée de deux couches :

1° l'endospore, large, gris mat, qui donne naissance à la membrane du bâtonnet germinatif.

2° l'ectospore, élastique, étroite qui est rejetée lors de la germination (GOTSCHLICH, 1912).

La spore de *B. mesentericus niger* est d'origine endogène. Elle est ovale, placée en général au milieu de la plastide.

ETUDE DE LA SPORE DANS LE SPORANGE

Examen sur le frais :

Examinons sur le frais, entre lame et lamelle une suspension dans l'eau physiologique de *B. mesentericus niger* (1). On

(1) En culture de 36 ou 48 heures.

observe des spores libres, incolores, très réfringentes et des bâtonnets isolés ou en chaînettes de plusieurs éléments.

A l'intérieur de certaines plastides bactériennes, on observe des plages plus ou moins réfringentes, de formes et de dimensions différentes, qui se colorent en rouge par la méthode d'ALESSANDRINI.

Des méthodes spéciales de coloration permettent d'identifier ces formations avec des grains « *sporogènes* », avec l'ébauche de spores, avec la spore jeune ou adulte.

Méthode d'ALESSANDRINI.

Les préparations traitées par la méthode d'ALESSANDRINI montrent les plastides colorées en vert intense et les spores en rouge.

Spores libres. — Les spores libres au repos peuvent se ramener aux deux aspects suivants :

1° Certaines spores ont leur membrane colorée en rouge-rubis et le cytoplasme a pris une teinte beaucoup moins intense.

2° D'autres spores, par contre, présentent une teinte uniforme rouge-rubis.

« Ces deux manières d'être vis-à-vis de la méthode d'ALESSANDRINI peuvent trouver une explication dans les hypothèses suivantes :

1° Les spores uniformément colorées et les spores présentant une partie centrale moins colorée correspondent à deux stades différents de l'évolution des formes de repos.

2° Ces deux catégories de spores sont les formes de repos de deux biotypes différents; c'est à l'expérience d'infirmar ou de confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses » (Ph. LASSEUR et M. BENOIT, 1934, p. 147).

Spores incluses dans le sporange. — A l'intérieur du sporange, on observe des plages de formes et de dimensions variables correspondant aux différents stades de la formation de la spore. Ces plages se colorent différemment du reste de la plastide: la membrane de la spore adulte (1) est rouge-rouge, tandis que le cytoplasme prend une teinte plus faible.

A un stade moins avancé, les spores sont plus petites, la membrane est colorée en rose et le cytoplasme n'est que très faiblement teinté. Il semble que la membrane apparait de très bonne heure.

L'appréciation de la coloration comporte une grosse part d'interprétation personnelle. Pour cette raison, je n'insisterai pas sur les grains sporogènes qui me paraissent teintés en rose très pâle.

Coloration de GRAM

Dans la méthode de GRAM, le sporange ne se colore pas uniformément en violet-noir. De même que dans la méthode d'ALESSANDRINI, on remarque une plage oblongue ou ovulaire que l'examen sur le frais a permis d'identifier avec la spore adulte ou l'ébauche de spore. Ici encore, il est difficile de préciser la coloration de cette plage: c'est ainsi que 6 opérateurs lui ont attribué les teintes suivantes: rosé, rose, gris-rose, gris, gris-violet.

Aucune spore libre n'est colorée en violet-noir. En général, la membrane de la spore a pris la coloration de contraste, tandis que le cytoplasme est coloré en gris ou gris-rose. En employant de forts grossissements, on perçoit quelquefois à un pôle de la spore, un petit grain violet-noir, se détachant nettement du cytoplasme.

En résumé, la méthode d'ALESSANDRINI, l'examen sur le

(1) A ce stade, la spore incluse dans la plastide a la même taille que les spores libres.

frais, entre lame et lamelle montrent que, dans les sporanges, les plages colorées en gris, gris-rose, rose, par la méthode de GRAM correspondent bien au grain sporogène, à l'ébauche de spore et à la spore adulte.

Voyons maintenant comment se comportent à ces méthodes de coloration les bâtonnets germinatifs.

II. — ÉTUDE DES BATONNETS GERMINATIFS

Pour éviter toute erreur d'interprétation, je n'ai considéré comme bâtonnets germinatifs que les germes encore adhérents, par une surface plus ou moins grande, à la membrane de la spore dont ils sont issus.

Méthode d'ALESSANDRINI

Comme nous l'avons vu, la spore libre au repos se colore généralement en rouge-rubis. La germination de la spore se traduit par un gonflement de la forme de repos, ce qui entraîne généralement une diminution de la colorabilité.

A ce stade de son développement, l'élément microbien ne se colore plus qu'en rouge faible.

A ce premier stade de la germination, on assiste à un amincissement de la membrane dans la zone équatoriale de la spore. Cet amincissement est tantôt uniforme, tantôt plus accentué en un point déterminé. L'élément bactérien qui s'organise à l'intérieur de la spore, continuant à croître, fait éclater la membrane. A un stade ultérieur, le bâtonnet germinatif s'engage dans la déchirure et, sous la forme d'une masse cylindrique verte (*fig. 15, c, Pl. I*), fait hernie à travers la membrane.

La germination se poursuivant, on observe les images *d*, *d*, *e*, *fig. 1, Pl. I*, ou encore *a*, *b*, *fig. 2, Pl. I*.

Finalement, l'élément germinatif se présente sous la forme

B. mesentericus niger.



Fig. 1.

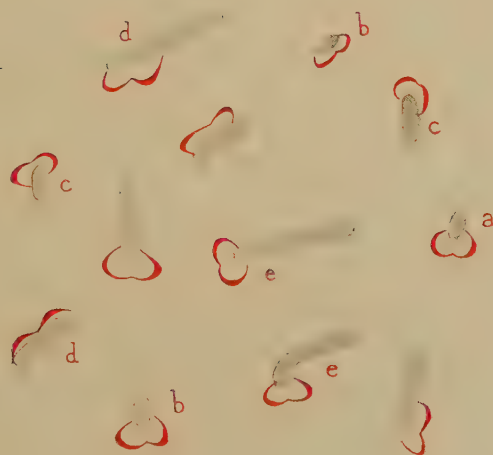


Fig. 2.

d'un bâtonnet typique de *B. mesentericus niger* (Pl. I, fig. 2, c, d). Dans certains cas, il est possible d'observer des éléments en diplo, dont un encore adhérent à la coque de la spore.

Méthode de GRAM

Pour étudier la vitesse de décoloration des bâtonnets germinatifs dans la méthode de GRAM, j'ai utilisé le protocole indiqué précédemment. Le temps d'action de l'alcool à 95 est de 10 minutes.

Ainsi qu'il fallait s'y attendre, on retrouve les mêmes figures de germination après coloration par la méthode de GRAM, qu'après coloration par la méthode d'ALESSANDRINI.

Avec la méthode de GRAM, la membrane est colorée en rouge (1) chez les spores non germées et en gris, gris-rose chez les spores germées.

Au tout premier stade de la germination, alors que le bâtonnet est différencié à l'intérieur de la spore, celui-ci prend déjà la coloration de GRAM (fig. 15, Pl. I). J'insiste sur ce fait maintes fois vérifié et par des observateurs différents.

Au stade un peu plus avancé (fig. 1, c, d₁, d₂, Pl. I et fig. 2, a, b, c), le bâtonnet rompt la membrane de la spore et il est coloré en violet-noir, tandis que la coque de la spore est gris-rose.

Poursuivant son développement, le bâtonnet germinatif atteint bientôt les dimensions des plastides adultes de *B. mesentericus* et se cloisonne.

On arrive ensuite à la division du bâtonnet germinatif (fig. 2, d, e, Pl. I). A tous ces stades, il garde la coloration de GRAM.

Dans quelques cas, l'empâtement des éléments bactériens par le colorant n'a pas permis de percevoir la cloison séparant

(1) D'intensité variable

deux plastides. C'est pour cette raison que dans les Tableaux IV et V certaines longueurs des bâtonnets germinatifs sont suivies d'un point d'interrogation. Ces valeurs peuvent correspondre à un ou deux éléments.

En résumé, les bâtonnets germinatifs de *B. mesentericus niger* même aux tout premiers stades de leur développement « prennent le GRAM » et ils ont une durée de décoloration supérieure à 10 minutes.

Dans les Tableaux IV et V, j'ai résumé les dimensions des bâtonnets germinatifs provenant de cultures âgées de 3 heures, 3 heures et demie, 4 heures, 4 heures et demie, 5 heures.

TABLEAU IV

B. mesentericus niger (souche COURMONT-ROCHAIX).

Age de la culture	Longueur des bâtonnets germinatifs	Age de la culture	Longueur des bâtonnets germinatifs
—	—	—	—
4 heures	0 μ 3	4 heures 30	1 μ 7
3 —	0 μ 4 ⁽²⁾	5 —	1 μ 8
4 —	0 μ 4 ⁽²⁾	4 — 30	1 μ 9
4 —	0 μ 55	5 —	1 μ 9
3 —	0 μ 6 ⁽²⁾	5 —	2 μ
4 —	0 μ 7	4 —	2 μ 5
4 —	0 μ 8	5 —	2 μ 7 ⁽³⁾
4 —	1 μ	4 — 30	3 μ ⁽²⁾
3 —	1 μ 2 ⁽³⁾	5 —	3 μ 6
5 —	1 μ 2 ⁽²⁾	5 —	4 μ 2 ⁽³⁾
5 —	1 μ 3 ⁽²⁾	5 —	5 μ 4 (?)
5 —	1 μ 5 ⁽²⁾		

Remarque. — Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de bâtonnets germinatifs offrant cette dimension. Je n'ai noté que les formes assez nettement différenciées les unes des autres, n'ayant aucune préoccupation statistique.

TABLEAU V

B. mesentericus niger

Age de la culture	Longueur des bâtonnets germinatifs
—	—
5 heures	3 μ 6
5 —	3 μ 8
5 —	5 μ 4 ⁽²⁾
5 —	4 μ 2
5 —	4 μ 8
5 —	6 μ 2 (?)
5 —	8 μ 4 (?)

Remarque. — Les longueurs indiquées dans ce tableau sont celles de deux bâtonnets germinatifs provenant d'une même spore initiale et dont l'un des deux est encore attaché à la spore.

Tous ces germes, depuis les formes courtes jusqu'aux formes longues, restent colorés en violet-noir après 10 minutes de décoloration par l'alcool à 95.

Les dimensions indiquées ci-dessus dans les Tableaux IV et V correspondent aux différents stades d'évolution (*fig. 2, a, b, c, d, e, Pl. I*) des bâtonnets germinatifs de *B. mesentericus niger*.

B. -- Expériences effectuées sur *B. subtilis*

(Souche LASSEUR, THIRY)

Avec *B. subtilis* (souche LASSEUR, THIRY), les stades initiaux de la germination sont très faciles à percevoir, que l'on observe le matériel sur le frais, entre lame et lamelle, ou après coloration.

Cependant, les avis des auteurs sont différents quant au mode de germination de la spore de *B. subtilis*. Du remarquable travail (p. 205) de M. H. SOULE, j'extrait le Tableau suivant :

TABLEAU VI

Mode de germination de *B. subtilis* COHN (1874)

COHN (1872-1875-1876)	Probablement polaire.
PRAZMOWSKI (1880)	Equatoriale.
MAGNIN (1880)	Cohn (1).
BREFELD (1881)	Equatoriale.
KLEIN (1884)	Polaire et équatoriale.
FLÜGGE C. Die Microorganismen, Leipzig, F. C. W. Vogel (1886, p. 317)	Prazmowski (2).
FRANKEL (1887)	Prazmowski (2).
CROOKSHANK E. M. Manuel of Bac- tériology, London H. K. Lewis (1887, p. 306)	Equatoriale.
DE BARY A., Vorlesungen über Bac- terien, Leipzig, W. Engelmann (1887, p. 28)	Prazmowski (2).
MACÉ E., Traité pratique de Bacté- riologie, Paris, J.-B. Baillière et fils (1889, p. 570)	Equatoriale.
GÜNTHER C., Einführung in das Stu- dium der Bactériologie. Leipzig, G. Thienn (1890)	Prazmowski (2)
WOOHEAD-SIMS, Bacteria and Their products, London, W. Scott (1891, p. 429)	Equatoriale.
SCHENK (1893)	Equatoriale.
LEHMANN et NEUMANN (1896)	Equatoriale.
MIGULA W., System der Bakterien. Iena G. Fischer (1900, p. 515)..	Prazmowski (2).
NOVY F.-G. Laboratory Work in Bacteriology, Ann. Arbor., G. Warch (1899, p. 212)	Equatoriale
GOTTHEIL (1901)	Equatoriale et oblique.
CHESTER (1901-1903)	Equatoriale et oblique.
LAURENCE et FORD (1916)	
TOPLEY et WILSON (1929)	Latérale.
ST-JOHN BROOKS (1930)	Equatoriale ou polaire.

(1) L'auteur se range à l'avis de Cohn.

(2) Les auteurs admettent les conclusions de Prazmowski.

Au cours de mes expériences sur *B. subtilis* (souche LASSEUR-THI-
RY) je n'ai observé que la germination équatoriale.

On retrouve avec *B. subtilis* des variations de colorabilité de la spore analogues à celles décrites précédemment pour *B. mesentericus niger*.

Méthode d'ALESSANDRINI

La méthode d'ALESSANDRINI permet de différencier les spores au repos (1) de *B. subtilis* en deux catégories : 1° les spores colorées uniformément en rouge-rubis ; 2° les spores dont la membrane est colorée en rouge-rubis, la partie centrale restant rose pâle.

Les spores en voie de germination se colorent différemment des spores libres au repos. Les premières prennent une teinte plus faible.

Lorsque le bâtonnet germinatif s'organise dans la spore, on observe l'image représentée Pl. II, *fig. 2 a*₁. La spore perd de son acido-résistance et seules les calottes de la spore restent colorées en rouge, alors que le corps central est vert. A ce stade, on ne remarque pas une augmentation de la taille de la spore.

A un stade ultérieur, la spore en germination grossit et prend un aspect triangulaire du fait de la rupture de la membrane en un point équatorial.

A un stade plus avancé (*fig. 2, a*₂, *a*₃, *b*, Pl. II) la membrane colorée en rouge présente un amincissement équatorial encore plus accusé. Au stade *c* (*fig. 3*, Pl. II), le bâtonnet germinatif ovoïde, coloré en vert, plus petit que celui observé avec *B. mesentericus niger*, s'engage dans la déchirure de la membrane. Les calottes polaires se colorent en rouge, ainsi que le reste de la membrane.

En *d* (*fig. 2*, Pl. II) et en *c, d, e* (*fig. 3*, Pl. II), l'élément germinatif fait saillie en dehors de la spore. Il offre un as-

(1) C'est-à-dire qui ne sont pas au stade de germination.

pect et des dimensions très variables. C'est tantôt une masse verte, ronde ou ovoïde (*fig. 3, c*, Pl. II), tantôt un bâtonnet vert, conique ou cylindro-conique (*fig. 3, d*, Pl. II) qui traverse la membrane de la spore colorée en rouge.

Puis le bâtonnet germinatif atteint la taille d'une plastide adulte. La germination des spores de *B. subtilis* paraît s'effectuer beaucoup plus rapidement que celle de *B. mesentericus*.

Méthode de GRAM

La spore de *B. subtilis* à l'état d'ébauche ou encore incluse dans le sporange se comporte vis-à-vis de la coloration de GRAM de la même façon que la spore de *B. mesentericus niger*.

Dans les deux cas, la spore se colore en gris, gris-rose, violet très faible, et il est difficile de préciser la teinte.

Dès les premiers stades de la germination (*fig. 2, a₁, a₂, a₃, b, c*, Pl. II), les spores prennent un aspect conique et se colorent uniformément en violet-noir. Il est très difficile de différencier la membrane de la spore de l'ébauche du bâtonnet germinatif. Il y a un empâtement des éléments microbiens. La coloration de GRAM ne respecte donc pas les détails cytologiques comme le fait la méthode d'ALESSANDRINI.

Les spores non germées sont colorées en rose. Au stade *c, d, e*, les bâtonnets germinatifs ont atteint une longueur de l'ordre de 1 μ 5 à 2 μ et ils se colorent toujours en violet-noir.

Lorsque le temps d'action de l'alcool est supérieur à 10 minutes, certains plastides adultes (1) prennent la coloration de contraste, tandis que les bâtonnets germinatifs gardent la coloration violet-noir.

Lorsque les bâtonnets germinatifs atteignent une longueur de 2 à 3 μ , on observe un aspect nouveau: c'est l'apparition

(1) Provenant du matérielensemencé.

B. subtilis.

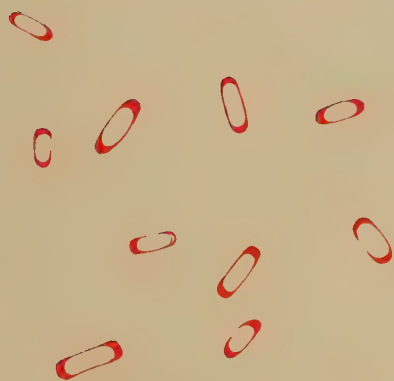


Fig. 1.

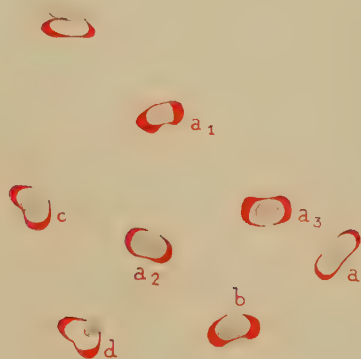


Fig. 2.

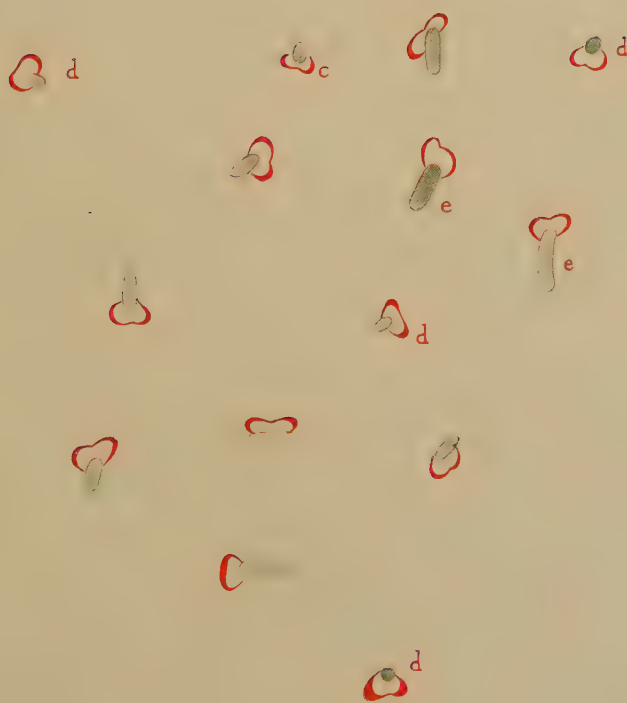


Fig. 3.

d'une plage sub-polaire colorée en rose. Cette plage est comparable, tant au point de vue de sa forme que de sa colorabilité, à l'ébauche de spore dans le sporange. On pourrait évidemment émettre des doutes sur l'identité des bâtonnets. Mais il s'agit bien là de bâtonnets germinatifs puisque ceux-ci ont encore, fixée à une de leur extrémité, la membrane de la spore dont ils sont issus.

Dans le Tableau VII, on trouvera les longueurs des bâtonnets germinatifs de *B. subtilis* provenant de culture en bouillon peptoné âgée de 3 heures, 3 heures et demie et de 5 heures.

TABLEAU VII

B. subtilis (souche LASSEUR, THIRY)

Age de la culture	Longueur des bâtonnets germinatifs	Age de la culture	Longueur des bâtonnets germinatifs
3 heures	0 μ 25	3 heures 30	1 μ 2 ⁽²⁾
3 —	0 μ 3	3 —	1 μ 3 ⁽²⁾
3 —	0 μ 5	3 —	1 μ 5
5 —	0 μ 55 ⁽¹⁾	3 —	1 μ 6
3 — 30	0 μ 7	3 — 30	1 μ 6
3 —	0 μ 8	3 —	1 μ 7
3 —	0 μ 9	3 — 30	1 μ 9
3 —	0 μ 9	5 —	2 μ 6
5 —	1 μ	5 —	2 μ 8
3 — 30	1 μ 1	5 —	3 μ

En résumé, les batonnets germinatifs de *B. subtilis* se comportent de la même façon que les batonnets germinatifs de *B. mesentericus niger* vis-à-vis de la coloration de GRAM. Dans les deux cas, les bâtonnets germinatifs restent colorés en violet-noir bien que soumis à l'action décolorante de l'alcool pendant 10 minutes.

Dans ces expériences, j'ai utilisé une solution de Violet de gentiane phéniquée et stabilisée et je n'ai considéré comme

batonnets germinatifs que les éléments observés dans des figures indiscutables de germination.

Or, les bâtonnets germinatifs de *B. mesentericus niger* et de *B. subtilis*, depuis les formes les plus courtes jusqu'aux formes les plus longues « prennent le GRAM » ou encore ils ont une durée de décoloration supérieure à 10 minutes dans l'alcool à 95 .

Dans ces conditions d'expériences, on observe donc des faits qui diffèrent de ceux étudiés par ZIRONI (1920).

CHAPITRE X

INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE

Le vieillissement de la plastide bactérienne peut déterminer des variations physico-chimiques importantes du cytoplasme et de la membrane, et par suite amener des modifications importantes de la colorabilité des plastides.

De même, la structure physico-chimique des éléments bactériens peut être sous la dépendance de la composition chimique du milieu de culture.

Les travaux de KRAMER (1891-1893-1895-1896), de LYON (1987) et les recherches récentes de LOBSTEIN (1922) établissent une relation étroite entre le milieu de culture et la composition du milieu, du moins pour certaines Bactéries. Le mode de nutrition des germes influencera donc plus ou moins fortement la colorabilité de ces éléments (MILLS (1892), SCHMIDT (1892), WILDE (1896), A. MEYER (1912), BRUDNY (1908).

A. SPINA (1897) augmente ou diminue la résistance des Bactéries à la coloration de GRAM en les cultivant sur milieu additionné ou non de tannin. D'après COHN la Levure de KLEIN se colore en violet-noir lorsqu'elle est cultivée sur gelose, alors qu'elle prend la coloration de contraste si elle provient de culture en bouillon. NEIDE observe des faits analogues avec *Bacterium tumescens*. Ce germe, en effet, cultivé sur milieu gélosé glucosé, offre une vitesse de décoloration plus grande qu'en culture sur milieu gélosé simple.

A. MEYER constate que des germes cultivés sur milieu gélosé

dextrosé se décolorent plus rapidement que ceux provenant de milieu sans dextrose.

Dans un récent travail, DELÉTANG (1933) obtient pour *S. pastorianus* des vitesses de décoloration différentes suivant que ce Champignon pousse sur carotte ou sur eau de levure maltosée.

En général, les auteurs ont fait varier plusieurs facteurs à la fois. Il est donc difficile de comparer les résultats qu'ils ont obtenus.

EISENBERG (1918) et Ph. LASSEUR (1927) n'ont pas observé de grandes variations dans les vitesses de décoloration en fonction de la composition du milieu, mais ils avaient surtout pour but de vérifier un point donné.

Si le fait de s'éloigner des conditions normales de nutrition peut être une cause d'erreur, il ne faut cependant pas en exagérer l'importance.

Envisageons maintenant un autre facteur : celui de la concentration du milieu en ion OH—.

BURKE et ASHENFELTER (1926) constatent que le pH du milieu peut influencer la réaction de GRAM. « *Les milieux acides diminueraient la colorabilité de Staphylococcus aureus, tandis qu'au contraire les milieux alcalins augmenteraient l'aptitude de ce germe à prendre la coloration de GRAM.* »

D'après les expériences de M. BEGUET (1927) l'abaissement de la tension superficielle du milieu peut modifier la faculté qu'ont les germes de « prendre » ou de « ne pas prendre la coloration de GRAM ».

CHAPITRE XI

ROLE DE LA MEMBRANE DANS LA RÉACTION DE GRAM

Pour expliquer le mécanisme de la Réaction de GRAM, on a proposé un grand nombre de théories. Pour des raisons didactiques, je les grouperai à deux catégories : l'hypothèse chimique et l'hypothèse physique.

Théorie chimique

UNNA (1888), GRIMME (1903), GUERBERT, A. MEYER et G. SCHAEFFER (1910), DEUSSIN (1918-1921), SCHUMACKER (1924-1926) s'inspirent des travaux d'OVERTON et défendent la théorie chimique. Pour ces savants, le mécanisme de la Réaction de GRAM se ramène à la formation d'un complexe « *tissu-colorant-iode* » qui reste intact ou est démoli par le solvant, suivant la nature du microbe mis en cause. Admettons que cette hypothèse soit exacte. Immédiatement une question se pose : Quel est l'élément qui entre en combinaison ?

L'examen de la littérature spéciale montre que les avis sont différents. Suivant certains auteurs (1) les matières grasses sont l'élément fixateur du colorant (SCHMITT; GUERBERT, MAYER et SCHAEFFER). D'autres savants attribuent ce rôle aux lipoprotéides (OVERTON, SCHUMACKER); enfin, DEUSSIN considère

(1) A la suite des essais de CEDERCREUTZ.

les nucléoprotéides comme l'élément primordial de la coloration de GRAM.

Théorie physique

A. FISCHER (1899), BRUDNY (1908), EISENBERG (1910), BENIANS (1919-1920), BURKE (1922), BURKE et BARNES (1928) ramènent le mécanisme de la Réaction de GRAM à une cause physique: la vitesse de décoloration des germes est fonction de la perméabilité de la plastide bactérienne aux colorants et surtout à l'iode. Quelles que soient les théories adoptées, on ne conçoit la coloration qu'autant que l'élément colorant a pu pénétrer à l'intérieur de la plastide bactérienne. Il est donc tout-à-fait rationnel d'étudier d'abord la perméabilité de la membrane des Bactéries lorsqu'on veut trouver une explication vraisemblable du mécanisme de la Réaction de GRAM.

Pour la rédaction de ce chapitre, j'ai fait de larges emprunts aux publications de Ph. LASSEUR et de ses Collaborateurs (1932-1933).

ETUDE DE LA MEMBRANE CHEZ LES BACTÉRIES

En raison de la petitesse de la plastide bactérienne, on ne sera pas surpris si l'existence d'une membrane délimitant l'élément bactérien fut tantôt admise, tantôt niée par les Microbiologistes que cette question passionne.

Au début, par analogie avec ce qu'on observe chez les Champignons et les Algues, la présence d'une membrane fut considérée comme un dogme. Puis l'opinion évolua à la suite des travaux de ZETTNOW.

En 1891, ZETTNOW traite une série de Bactéries (*Spirillum serpens*, *Spirillum undula*, *B. proteus*) par la méthode de

LÖEFFLER. Dans ces conditions d'expérience, l'auteur observe : 1° la présence d'un corps central très coloré ; 2° l'existence de parties difficilement colorables, situées soit aux deux extrémités de l'élément bactérien, soit sur ses parties latérales. La couche incolore ou peu colorée paraît enroulée en spirale autour de la masse centrale colorée. Avec KLEBS (1884) et BUTSCHLI (1890), ZETTNOW considère comme un noyau la partie centrale de la Bactérie qui se colore facilement par les colorants nucléaires. Les régions polaires ou latérales qui demeurent incolores en présence des mêmes colorants correspondraient au plasma.

Poursuivant ses recherches, ZETTNOW (1897) colore les Spirilles par le Bleu de méthylène à des concentrations telles que les Bactéries ne soient pas tuées. Dans ces conditions, les Spirilles montrent l'existence :

1° d'une masse centrale colorée, à structure alvéolaire ;

2° d'espaces clairs que l'auteur identifie au plasma des Bactéries. Cette image est celle que l'on observe après des temps de coloration de quelques minutes. Si on augmente le temps de contact ou la concentration de la solution colorante, les corps bactériens se colorent d'une façon uniforme.

En 1897, ZETTNOW n'apporte, en faveur de sa théorie, aucun fait nouveau : il ajoute cependant que toutes ses recherches « ont été vaines pour mettre en évidence une membrane chez les Spirilles et chez *B. granulosus*. Les Spirilles peuvent être enveloppés par une couche qui ne se laisse colorer que par les méthodes de coloration des fouets. Le plus souvent, cette formation ne s'observe qu'aux extrémités polaires des Bactéries. Avec les fouets, elle correspond au plasma, à la couche corticale de BUTSCHLI ».

A l'aide de la méthode de ROMANOWSKI, ZETTNOW (1899) teinte en rouge la majeure partie de l'élément bactérien : c'est le noyau. Cet auteur propose de désigner sous le nom d'« *ektoplasma* » la partie qui se colore après morçandage mais

reste incolore dans la méthode de ROMANOWSKI. Les régions colorées en bleu par cette même méthode correspondent à l'« *entoplasma* ». Cette division est arbitraire, et ZETTNOW reconnaît que, chez certains germes, il est impossible de mettre l'« *entoplasma* » en évidence. Ce dernier peut faire défaut, ou être intimement mélangé à la chromatine.

FEINBERG (1900) signale des faits analogues à ceux observés par ZETTNOW.

BUTSCHLI, en 1890, décrivait déjà chez les Bactéries la présence d'un corps central (noyau) entouré d'une couche de protoplasme plus ou moins visible. En 1902, cet auteur se rallie à la thèse de ZETTNOW.

La question paraissait résolue, mais en 1909, Ph. EISENBERG écrit « *nous voulons nous en tenir à cette conception et maintenir séparées les deux formations désignées sous le nom de membrane et de couche corticale dont l'ensemble forme l'ectoplasme. Cette manière de voir ne concorde pas complètement avec la conception de ZETTNOW, cet auteur voulant réunir avec la partie non colorable du corps cellulaire la couche extérieure de la partie colorable* ». (Page 469).

EISENBERG traite des Bactéries par la méthode de CLAUDIUS et pousse très loin la décoloration par le chloroforme : les plastides ne sont pas colorés de façon uniforme ; elles montrent une couche extérieure fortement colorée, tandis que l'intérieur du bâtonnet est décoloré. Ce fait est d'ordre général. Il s'observe avec tous les germes « *prenant le GRAM* ».

Des résultats analogues sont obtenus par Ph. EISENBERG lorsqu'il traite des Bactéries par sa méthode Aurantia-Violet de méthyle B.

En résumé, en allant de l'extérieur à l'intérieur de la plastide on trouverait successivement : la membrane, l'ectoplasme et l'endoplasme.

GOTSCHLICH (1912) se range à l'avis de ZETTNOW. Il admet que le corps bactérien est constitué par une substance nuclé-

aire (chromatine) mélangée à du protoplasme modifié l' « *ektoplasma* ». Cependant l'auteur éprouve certaines difficultés à expliquer les faits relatifs aux Vibrions.

En 1929, le savant microbiologiste allemand conserve la division en « *ektoplasma* » et « *entoplasma* » sans admettre l'existence de la « *membrane cellulaire* ».

GUSTSTEIN (1924) ayant plus particulièrement en vue l'étude du mécanisme de la coloration de GRAM, a été amené à admettre la théorie de l'ectoplasme.

R. LEGROUX et J. MAGROU (1920), dans une belle étude sur « *l'état organisé des colonies bactériennes* » distinguent, dans chaque élément bactérien, deux parties : l' « *entoplasme bactérien* » et l' « *ectoplasme bactérien* ».

Cependant, l'existence de la membrane chez les Bactéries est admise par la majorité des auteurs : DE BARY (1884), A. FISCHER (1895), A. MEYER (1912) et ses élèves, NEIDE (1904), GRIMME (1902), GUILLERMOND, BEAUVÉRIE, HOLLANDE, Ph. LASSEUR (1911), LASSEUR et VERNIER (1911), LASSEUR et VERNIER (1933). ROLIN (1929), MINOUX (1927), A. DUPAIX (1933), L. GEORGES (1933).

Par des méthodes appropriées (1). A. MEYER (1912) met en évidence la membrane qui se teinte d'une façon différente du protoplasme. Pour A. MEYER la membrane se compose : 1° d'une couche interne très réfringente, facilement colorable, riche en matières sèches ; 2° d'une couche externe peu réfringente, difficilement colorable et pauvre en matières sèches. Le développement exagéré de cette couche constitue la « *capsule* » des Bactériologistes.

Ph. LASSEUR et P. VERNIER (1933) suivent le cycle évolutif de *B. mesentericus niger* à partir de la spore. L'examen est effectué sur le frais, avec ou sans coloration vitale, et à l'ultra-

(1) Coloration au Bleu de méthylène, au Soudan, à la Fuchsine formol.

microscope. Après coloration à la fuchsine formolée, les bâtonnets germinatifs offrent un aspect « *qui rappelle assez une échelle tant les parois latérales et les cloisons transversales se détachent nettement du reste de la plastide bactérienne. A cette couche parfaitement régulière qui limite la plastide bactérienne qui se colore de la même façon que les cloisons de division, nous croyons pouvoir donner le nom de membrane* » (Ph. LASSEUR et P. VERNIER, 1933).

L'étude de la vitesse de décoloration de *B. mycoïdes* dans la méthode de GRAM, m'a permis de mettre en évidence une membrane. J'ai observé, après 5 heures d'action du décolorant l'aspect représenté par les *fig. 2 et 3*, Pl. IV.

Dans certains filaments, les plastides se différencient facilement les uns des autres. Les cloisons transversales et les parois latérales colorées en violet-noir se détachent nettement de la masse centrale qui, elle, est arrivée au stade de décoloration, c'est-à-dire à la teinte voisine de la coloration 503 du code des couleurs, mais plus faible que celle-ci (Test. LASSEUR, 1927).

THÉORIES RELATIVES

A LA PERMÉABILITÉ DE LA MEMBRANE

Considérant l'existence de la membrane comme démontrée, je vais envisager une question tout aussi complexe, celle de la perméabilité de la membrane, question qui me conduit à envisager successivement le métabolisme bactérien et la coloration des plastides bactériennes.

Je vais donc passer rapidement en revue les différentes théories :

I. — THÉORIE DU VOLUME MOLÉCULAIRE

Pour COLLANDER (1924), la membrane fonctionne comme un tamis et les substances colloïdes ou cristalloïdes passent

d'autant plus facilement que les pores de la membrane sont plus gros et les molécules ou les micelles plus petites.

II. — THÉORIE DES LIPOÏDES

La pénétration d'une substance S. dans une cellule C. dépend de la solubilité de S. dans la couche lipoidique (lécithine + cholestérine) qui entoure le protoplasme. (Théorie d'OVERTON).

III. — THÉORIE COLLOÏDALE

Cette théorie repose sur la nature colloïdale des cellules (HANSTEEN, CRANNER 1914-1919-1922; HAYNES, 1921).

IV. — THÉORIE DE L'ADSORPTION

TRAUBE (1910-1911) croit donner une interprétation plus rationnelle en faisant intervenir la notion de « *pression de surface* ».

V. — THÉORIE DE L'ULTRA-FILTRE

La membrane fonctionne comme un tamis et la vitesse de pénétration d'une molécule est fonction de son volume (RUHLAND, 1908).

VI. — THÉORIE DE LA DIFFÉRENCE DE POTENTIEL

Les membranes possèdent une charge électrique dont la grandeur et le signe varient d'une membrane à l'autre. Pour MICHAELIS (1926), les membranes ne laissent passer que

les ions de signe contraire, tandis que pour la majorité des auteurs, W. OSWALD (1919), Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs (1913), KOPAZEWSKI (1930), etc., seuls passent les ions de charge de même signe.

VII. — THÉORIE DE LA MEMBRANE COMPLEXE

La membrane serait formée d'une mosaïque de particules, les unes perméables aux ions, les autres aux cations (R. HÖBER, 1930).

VIII. — THÉORIE DE PIERRE GIRARD

Pierre GIRARD se place à un point de vue beaucoup plus général que les auteurs précédents. Il fait intervenir la notion d'adsorption sélective et de polarisation de la paroi.

FACTEURS INFLUENÇANT LA PERMÉABILITÉ DE LA MEMBRANE

Aucune des théories précédentes n'est capable d'interpréter l'ensemble des phénomènes observés. Ceci peut s'expliquer par la multiplicité des facteurs régissant la perméabilité de la membrane. Certains de ces facteurs jouent un rôle important dans la Réaction de GRAM. C'est ainsi que la charge électrique des plastides bactériennes, la réaction du milieu (pH), le point iso-électrique, l'action des électrolytes sur la pénétration des colorants peuvent modifier d'une façon considérable la *vitesse de décoloration* des Bactéries.

CHARGE DES PLASTIDES BACTÉRIENNES

Si on détermine, dans une suspension de plastides bactériennes, un champ électrique on voit les plastides se diriger vers une des électrodes. Pour NEISSER et FRIEDMANN (1904),

les Bactéries émigrent vers l'anode. Mais dans les expériences de V. HENRI et Mademoiselle CERNOVODEANU (1906), dans celles de CLUZET, ROCHAIX et KOFMAN (1923), de KOFMAN (1926), toutes les Bactéries n'ont pas une charge négative. C'est ainsi que les Bacilles dysentériques de FLEXNER, de HISS, le Bacille paratyphique B. se dirigent vers la cathode.

Cependant, la majorité des auteurs admet que les germes ont une charge négative.

Ph. LASSEUR et L. SPILLMANN (1921), Ph. LASSEUR et R. FRIBOURG (1928), Ph. LASSEUR, M. MOREL et A. DUPAIX (1929); Ph. LASSEUR, R. FRIBOURG, A. DUPAIX, R. LECAILLE et J. SERRA (1930); Ph. LASSEUR, A. DUPAIX, M. OLIVIER (1931); Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et R. FRIBOURG (1934) dans leurs travaux sur le Mécanisme de CHARRIN et ROGER ont déterminé la charge électrique de nombreuses Bactéries. Toutes les espèces bactériennes expérimentées par ces auteurs sont transportées vers le pôle positif.

La méthode macroscopique utilisée, en 1929, par Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs est venue confirmer les résultats obtenus avec la méthode microscopique. « *Toutes les Bactéries (y compris les Bacilles dysentériques, paratyphiques) et tous les Champignons expérimentés sont transportés au pôle positif lorsqu'ils sont en suspension dans l'eau distillée* » (Ph. LASSEUR, A. DUPAIX, R. LECAILLE et J. SERRA, 1929).

E. SORU (1929) constate aussi « *l'existence d'une charge négative aussi bien pour le Bacille typhique que pour B. tumefaciens normal quelque soit le pH et même pour des valeurs du pH correspondant à une très forte acidité.* »

V. HENRI et Mademoiselle CERNOVODEANU (1906) voient, dans la variation des charges électriques des Bactéries une explication de la différence de coloration (1) entre le Bacille dysentérique de FLEXNER et les autres germes.

(1) A la thionine ou à la fuchsine acide (non phéniquée).

Par contre, WINSLOW et UPTON (1926), BURKE et GIBSON (1933) ne trouvent aucune relation entre la charge électrique des Bactéries et la réaction de GRAM.

BURKE et GIBSON effectuent leurs essais sur une Levure « GRAM-positive » et sur le Colibacille en suspension dans l'eau distillée ajustée à des pH déterminés. La différence de potentiel est mesurée avec l'appareil modifié de NORTHROP (1922). Des préparations provenant des suspensions aux différents pH sont colorés par la méthode de GRAM.

Dans le tableau donné par BURKE et GIBSON, la vitesse de transport du Colibacille croît de pH = 1,5 à pH = 8,5. A partir de ce pH elle diminue et atteint une valeur nulle pour pH = 13,5. Cette diminution ne s'explique pas puisqu'il y a apport continu d'ion OH—. Or, l'addition d'ions OH— n'amène pas une neutralisation : ces ions s'ajoutent.

RÉACTION DU MILIEU

La réaction du milieu peut modifier le comportement des Bactéries vis-à-vis de la coloration de GRAM. Pour E.-W. STEARN et A.-E. STEARN (1924), en milieu fortement alcalin, les Bactéries « GRAM-négatives » peuvent devenir « GRAM-positives ». BURKE et ASHENFELTER (1926) n'ont pas vérifié ce fait, mais il résulte des expériences de ces auteurs que les germes « prenant le GRAM » ne gardent pas la coloration violet-noir s'ils proviennent de milieux fortement acides. C'est pour cette raison que BURKE et ASHENFELTER ajoutent au milieu de culture des solutions tampons de façon à amener le milieu au pH optimum de croissance pour une espèce bactérienne donnée. Lorsqu'il est impossible de contrôler la réaction du milieu, KOPELOFF et BEERMANN (1922), BURKE et ASHENFELTER additionnent la solution colorante de Violet de gentiane d'une solution de bicarbonate de soude et utilisent la solution alcaline d'iode.

L'étude des travaux sur le pouvoir bactéricide des colorants entre à un certain point de vue dans les limites de cette question puisque les colorants sont ajoutés au milieu de culture.

Pour GASSNER (1918), le jaune de métachrome, additionné à un milieu de culture, est sans action sur les germes « *ne prenant pas le GRAM* », tandis qu'il se montre toxique pour les germes « *prenant le GRAM* ». Dans ce dernier cas, GASSNER conclut que les plastides qui prennent la coloration violet-noir dans la méthode de GRAM sont perméables au colorant toxique et qu'il y a fixation par adsorption de la matière colorante. Par contre, les germes qui se multiplient normalement en présence du colorant sont imperméables.

De même, pour CHURCHMANN (1912) les Bactéries « *GRAM-positives* » et les Bactéries « *GRAM-négatives* » n'offrent pas la même résistance aux antiseptiques. CHURCHMANN classe les germes suivant leur résistance à l'action bactéricide du Violet de gentiane, et il s'efforce de faire coïncider ce classement avec les deux groupes de Bactéries : celles « *qui prennent le GRAM* » et celles « *qui ne prennent pas le GRAM* ». Mais comme nous l'avons vu, il n'y a pas de coupure nette entre ces deux catégories de germes. Aussi ne faut-il pas s'étonner si CHURCHMANN éprouve des difficultés à classer certains types intermédiaires.

EISENBERG (1923), étudiant l'action toxique de 115 couleurs d'aniline différentes, basiques et acides, montre que ces colorants, du point de vue antiseptique, sont beaucoup plus actifs sur les germes « *prenant le GRAM* » que sur ceux « *ne le prenant pas* ».

Pour PRÓWAZEK (1910) ; BROWNING, GULBRANSEN et KENNAWAY (1920) ; FLEISCHER et AMSTER (1923) ; E.-W. STEARN et A.-E. STEARN (1924), le pouvoir antiseptique des colorants basiques croît lorsque le milieu de culture devient alcalin.

FLEISCHER et AMSTER (1923) envisagent deux hypothèses pour interpréter les résultats obtenus :

1° Le pH du milieu modifie le pouvoir d'adsorption des Bactéries ;

2° Il amène des modifications du colorant : variation d'ionisation, transformation moléculaire dues à l'apparition ou à la disparition de doubles liaisons.

Pour KLIGER (1911), le pH du milieu affecterait plutôt la plastide bactérienne que le colorant.

Pour SERRA (1932), « l'élévation du pH de 4 à 7 augmente le pouvoir antiseptique des colorants étudiés (1). Cette augmentation se produit quand on passe de pH = 5 à pH = 6, c'est-à-dire lorsqu'on se place du côté alcalin du point isoélectrique : les colorants pouvant se combiner dans ces conditions à la plastide bactérienne ».

En résumé, il résulte de l'analyse de ces travaux que :

1° Les matières colorantes seraient plus toxiques pour les Bactéries qui « prennent le GRAM » que pour celles qui « ne prennent pas le GRAM » et cela s'expliquerait par la différence de perméabilité entre ces deux groupes de germes ;

2° Les ions H^+ et OH^- modifient le pouvoir bactéricide des colorants acides et basiques.

(1) Colorants dérivés du triphénylméthane.

CHAPITRE XII

FIXATION DU COLORANT SUR LES PLASTIDES BACTÉRIENNES

Le pouvoir bactéricide des colorants est fatalement lié à leur pénétration dans la plastides bactérienne. Or, l'ensemble des travaux sur la fixation des colorants par les plastides bactériennes montre que les ions OH^- facilitent la pénétration des colorants basiques et les ions H^+ celle des colorants acides. On peut, il est vrai, admettre que la mort des Bactéries est déterminée par le dépôt d'un film colorant à la surface de la plastide, c'est-à-dire par adsorption. Cette théorie, adoptée pour expliquer les phénomènes de teinture, rend compte aussi de ce fait : l'addition d'ions OH^- augmente le pouvoir tinctorial des colorants basiques, les ions H^+ exaltent le pouvoir tinctorial des colorants acides.

TRANSPORT ÉLECTRIQUE DES SOLUTIONS COLORANTES

Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et G. REHN (1933) ont étudié le sens et la vitesse de migration d'un certain nombre de colorants, en fonction de la concentration en ions H^+ de la solution colorante.

Il résulte, de leurs expériences que le transport des solutions colorantes en présence des ions H^+ n'est pas un phénomène simple.

DIFFUSION ET DIALYSE

Les essais de diffusion et de dialyse ont montré que les colorants nettement colloïdaux ont une faible vitesse de diffusion, les colorants moléculaires, au sens d'OSWALD diffusent plus rapidement. Cependant, il est possible d'augmenter cette diffusion dans des proportions très importantes, de 1 à 7, en faisant varier le pH.

La dialyse nous conduit à des conclusions de même ordre que la diffusion. Les colorants colloïdaux, Bleu Victoria, Rouge Congo..., ne dialysent pas. Les colorants dit moléculaires donnent des résultats très variables. C'est ainsi que le Bleu de méthylène, le Rouge neutre dialysent à une vitesse égale à celle de la Fuchsine acide. Mais la dialyse ou l'ultrafiltration varient dans de très larges limites quand on modifie la concentration en ions H^+ .

En faisant passer le pH de $pH = 2,2$ à $pH = 6$, la quantité de colorant qui traverse la membrane de collodion varie de 10 à 1. Nous voyons donc déjà combien est complexe la fixation d'un colorant sur une membrane non organisée.

FIXATION DES COLORANTS PAR LES PLASTIDES BACTÉRIENNES

Dans des recherches approfondies sur la fixation des colorants par les éléments microbiens, Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et L. GEORGES (1933) constatent l'influence capitale de la concentration en ions H^+ sur la fixation du Bordeaux B., du Bleu de méthylène, de la Safranine, du Rouge neutre, du Bleu d'aniline, de la Nigrosine, de la Fuchsine acide, du Bleu de crésyl par différentes espèces bactériennes.

Tout d'abord, les différentes espèces microbiennes peuvent se comporter de façon différente vis-à-vis d'un colorant donné. C'est ainsi qu'à $pH = 4$ *B. caryocyaneus* fixe 75 mmgr. de Bordeaux B. et *B. mesentericus* 225 mmgr.

Toutes les courbes offrent un maximum de fixation compris dans une zone allant de $\text{pH} = 2,25$ à $\text{pH} = 3,5$. Les quantités les plus faibles de colorants fixés s'observent entre $\text{pH} = 6,5$ et $\text{pH} = 8$. Avec les colorants basiques, on constate aussi des différences importantes dans la quantité de colorant fixé par les diverses espèces bactériennes. Là encore, on remarque un maximum de fixation qui se trouve aux environs de $\text{pH} = 4,2$ et des zones de fixation minima comprises entre $\text{pH} = 6$ et $\text{pH} = 7,2$. Avec la Safranine, l'influence de l'espèce bactérienne est surtout sensible dans la zone de pH comprise entre $\text{pH} = 4,2$ et $\text{pH} = 6,1 - 6,2$.

L'influence de la concentration en ions OH^- est capitale lorsqu'il s'agit de fixer le Bordeaux B. ou la Safranine par *B. caryocyanus*. Pour des pH très alcalins, la fixation peut être pratiquement nulle en ce qui concerne le Bordeaux B. Mais tous les germes ne se comportent pas de la même façon. C'est ainsi que la fixation du Bleu de méthylène et de la Safranine par *B. mesentericus niger* n'est pas très influencée par la concentration en ions OH^- . Cela tient évidemment à la structure particulière de ce germe considéré comme « *prenant le GRAM* ».

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

Il est évident que la température joue un rôle important dans la fixation des colorants, et les températures susceptibles de déterminer la mort des plastides bactériennes modifient considérablement la fixation du colorant. Les différentes espèces bactériennes ne réagissent pas identiquement aux variations de température.

Par chauffage des plastides à 100° , on augmente considérablement la quantité de Bordeaux B. fixée et on diminue l'intensité de fixation de la Safranine pour un germe donné (*B. caryocyanus*).

INFLUENCE DES IONS H^+ ET OH^-

SUR LA FIXATION DES COLORANTS

Lorsqu'on étudie comparativement la fixation d'une série de colorants basiques, on constate que, malgré des divergences assez importantes, on peut classer les courbes de fixation en deux groupes :

1° courbe de fixation des colorants acides ;

2° courbe de fixation des colorants basiques.

L'expression de colorants basiques et de colorants acides, sous-entend la notion de charge électrique, les colorants basiques étant des colorants positifs et les colorants acides étant des colorants négatifs.

Il faut faire intervenir une autre notion : celle de la tension superficielle. On conçoit qu'il soit possible de faire varier celle-ci par addition de certaines substances aux colorants.

L'addition d'ions H^+ à un bain de teinture augmente le pouvoir tinctorial d'un colorant acide, tandis que les ions OH^- augmentent celui des colorants basiques.

De même, les expériences de Ph. LASSEUR montrent que l'addition d'ions H^+ à un système colorant renfermant des plastides bactériennes augmente la fixation du colorant, lorsque ce dernier est acide et la diminue s'il est basique. On observe des phénomènes inverses avec les ions OH^- qui, eux, favorisent la fixation des colorants basiques par l'élément microbien et diminue celles des colorants acides.

Les ions H^+ ou OH^- peuvent agir directement sur les plastides ou sur la dissociation électrolytique des colorants. Le premier groupe d'action modifie la charge électrique et par suite la tension superficielle.

HYDRATATION DES PLASTIDES BACTÉRIENNES

Mais il est un autre phénomène très curieux sur l'importance duquel Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs ont insisté longuement. C'est l'hydratation des plastides sous l'action des ions OH—.

Dès 1921, LASSEUR met en garde contre le pouvoir stabilisant des ions OH— dans l'agglutination sérique des Bactéries.

Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et M. OLIVIER (1930) constatent que l'addition de solutions tampons de l'ordre de $\text{pH} = 9$ à une solution bactérienne détermine l'éclaircissement de cette suspension. L'examen à l'ultra-microscope montre que les éléments microbiens n'ont pas été peptisés, mais qu'ils sont simplement devenues invisibles à l'œil et à l'examen microscopique ordinaire (par transparence). Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et M. OLIVIER ont conclu à l'hydratation des plastides bactériennes.

Des recherches ultérieures de Ph. LASSEUR et A. DUPAIX (1931) montrent que les ions OH— déterminent bien une hydratation entraînant un gonflement considérable des plastides qui ne peut être perçu qu'à l'ultra-microscope. On conçoit que les Bactéries hydratées fixeront des quantités de colorant beaucoup plus faibles que les Bactéries normales.

Toutes les Bactéries ne se comportent pas de la même façon. Certaines offrent une grande résistance aux ions OH—. Tels sont *Staphylococcus aureus*, *B. mesentericus niger*, *B. megatherium*, *B. subtilis*. D'autres, au contraire, sont très sensibles à l'action des ions OH— : *B. pyocyaneus*, *B. caryocyanus*, *B. Coli communis*, *B. proteus*. Pour L. GEORGES (1933) il semble qu'ils existe chez les Bactéries « un parallélisme entre la résistance aux ions OH—, et leur résistance au décolorant, dans la méthode de GRAM ».

En résumé, les belles recherches de Ph. LASSEUR et de ses

Collaborateurs, A. DUPAIX-LASSEUR, L. GEORGES, M.-A. RENNAUX, montrent que :

1° **Les Bactéries « prenant le Gram » sont généralement plus sensibles à l'action des ions H^+ et moins sensibles à l'action des ions OH^- — que les Bactéries « ne prenant pas le Gram ».**

2° **Les ions H^+ augmentent la fixation des colorants acides par les plastides bactériennes, et les ions OH^- — la fixation des colorants basiques.**

Ayant particulièrement en vue l'étude de la perméabilité de la membrane, Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs ont expérimenté sur des plastides rigoureusement lavées et mises en suspension dans de l'eau distillée, amenées à un pH déterminé. Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs se sont efforcés d'éliminer les causes d'erreur en évitant les précipitations de colorants dues aux traces de milieu entraîné lors de la mise en suspension des corps bactériens. Leurs expériences ne sont pas exactement comparables à celles effectuées par E.-W. STEARN et A.-E. STEARN. En effet, ces auteurs ont opéré sur Bactéries desséchées et fixées.

FIXATION DES COLORANTS PAR DES ÉLÉMENTS BACTÉRIENS

AU PRÉALABLEMENT FIXÉS ET DESSÉCHÉS

E.-W. STEARN et A.-E. STEARN (1923) étudient le « rôle du pH dans la détermination du GRAM d'un organisme donné ».

Les Bactéries sont considérées par ces auteurs comme des ampholytes : les plastides tendent à fixer les colorants basiques en milieu alcalin et les colorants acides en milieu acide. Mais aucun argument décisif n'est apporté en faveur du caractère ampholyte des Bactéries. De plus, il existe une zo-

ne (1) — la zone iso-électrique — pour laquelle les plastides ne fixent que peu ou même pas de colorant.

Les expériences des savants américains ont été effectuées avec le Bacille diphtérique, le Colibacille, et *Staphylococcus aureus*...

Les solutions colorantes de Violet de gentiane (basique) et de Fuchsine (acide) sont mélangées et amenées à des pH déterminés au moyen de solutions tampons. L'action du mélange colorant est complétée par celle de l'iode.

Il résulte de ces essais qu'à un pH inférieur à 2,4, toutes les Bactéries fixent les colorants acides et à un pH supérieur à 10,2 les colorants basiques. Au point iso-électrique, les colorants seraient peu ou pas fixés.

Dans une deuxième série d'expériences, E.-W. STEARN et A.-E. STEARN font agir séparément chaque colorant sur le mélange des trois germes: Colibacille, Bacille diphtérique et *Staphylococcus aureus*.

De l'examen des courbes données par ces auteurs, il résulte que: *Staphylococcus aureus* fixe le colorant basique au-dessus de $\text{pH} = 3$, le Colibacille au-dessus de $\text{pH} = 8$ et le Bacille diphtérique au-dessus de $\text{pH} = 5$. En-dessous de $\text{pH} = 3$, *Staphylococcus aureus* commence à se décolorer.

E.-W. STEARN et A.-E. STEARN arrivent aux conclusions suivantes:

1° « Les organismes « GRAM-positifs » peuvent devenir « GRAM-négatifs », par une acidité croissante » du bain colorant.

2° « L'effet opposé peut être produit par une alcalinité croissante. »

Les conclusions de E.-W. STEARN et A.-E. STEARN (1924) n'entraînent pas la conviction du Lecteur.

(1) Pour E.-W. STEARN et A.-E. STEARN, cette zone isoélectrique est comprise entre le point isoélectrique de la protéine bactérienne et le point isoélectrique du lipide bactérien.

On peut objecter à ces savants que :

1° Le mélange des deux solutions colorantes Violet de gentiane (basique) et Fuchsine (acide) peut déterminer une précipitation malgré les précautions prises par les savants américains. La précipitation n'a lieu que pour une différence de potentiel critique, quelle que soit la charge de la particule. Pour obtenir une solution stable, il suffira donc d'amener les particules dispersées à une différence de potentiel critique (en valeur absolue).

2° L'addition de solution tampon peut produire une modification des substances colorantes, ainsi que l'ont montré Ph. LASSEUR et SERRA (1921), SERRA (1932). « *L'addition d'ions OH— augmente l'hydrolyse des colorants, et fait apparaître une quantité plus grande de carbinol qui serait plus actif que le sel* » (SERRA, 1932, p. 136).

Les savants américains veulent montrer en particulier que l'allure des courbes de fixation du colorant acide et du colorant basique varie suivant que l'on utilise une Bactérie « GRAM-positive » ou une Bactérie « GRAM-négative ».

Or, il est impossible de donner une expression numérique exacte du degré de coloration d'une plastide fixée sur une lame.

RECHERCHES PERSONNELLES

TECHNIQUE

MATÉRIEL BACTÉRIEN

Les essais ont porté sur *B. mesentericus niger* (souche COURMONT, ROCHAIX), et sur *B. subtilis* (souche MICHIGAN).

Les Bactéries sont cultivées sur gélose peptone distribuée en boîte de ROUX. La gélose peptone est ajustée à pH = 7.

Les corps microbiens proviennent de cultures âgées de 40 heures et effectuées à la température du laboratoire.

SUSPENSION MICROBIENNE

Les cultures, sur boîte de ROUX, sont recouvertes d'eau distillée stérile. Par un mouvement de va et vient et de bascule les germes sont mis en suspension dans l'eau. Les corps microbiens sont alors soumis à trois lavages successifs dans l'eau distillée. Après agitation des corps microbiens avec des billes de verre, on sépare, par centrifugation fractionnée, les amas qui auraient pu résister à l'action mécanique.

La suspension homogène, ainsi obtenue, est amenée, par dilution convenable, à une concentration de 40 milliards de germes par cm^3 .

SOLUTIONS TAMPONS

Pour amener les suspensions bactériennes à des valeurs de pH déterminées, j'ai utilisé des solutions tampons de composition différente, préparées suivant les indications de CLARK (1923):

1° La solution de MAC ILVAINE (1921) (solution d'acide citrique à 21 gr. 0/00 + solution de phosphate de sodium à 35 gr. 60 0/00) pour la zone de pH allant de $\text{pH} = 2$ à $\text{pH} = 8$.

2° Solution de SÖRENSEN (solution d'acide borique à 12 gr. 40 0/00 + solution de chlorure de potassium à 14 gr. 912 0/00 + solution de soude normale) pour $\text{pH} = 8$, $\text{pH} = 9$ et $\text{pH} = 10$.

3° Solution de RINGER (solution de phosphate disodique à 27 gr. 232 0/00 + solution de soude normale) pour $\text{pH} = 11$, $\text{pH} = 12$, et $\text{pH} = 13$.

4° Solution de DAVID (1) (solution d'acide citrique à 21 gr. 0/00 + solution de citrate alcalin).

(1) Le citrate de potassium a été remplacé par du citrate de sodium.

Enfin, j'ai employé des solutions d'acide sulfurique, d'acide citrique et de soude.

DÉTERMINATION DU pH

Le pH est déterminé à l'aide de l'électrode rotative de LECOMTE DU NOÛY et du potentiomètre de TINSLEY.

TEMPS DE CONTACT

Dans une série de tubes *a, b, c, d*, on distribue successivement 2 cm³ de solutions tampons puis 2 cm³ de la suspension microbienne homogène. Les mélanges ainsi obtenus sont abandonnés pendant 4 heures et demie à la température du laboratoire. Puis on prélève une partie aliquote du mélange, afin d'effectuer des préparations sur une série de lames porte-objet.

Après étalement, les préparations sont abandonnées pendant 12 heures à la température du laboratoire, à l'abri des poussières de l'air.

On procède ensuite à la fixation par chauffage de 2 minutes à la température de 112° C. (température de fusion de la résorcine). Puis les préparations sont immergées dans l'eau distillée portée à 30° C. Le lavage a pour but d'éliminer les électrolytes des solutions tampons.

Sans cette précaution, on superposerait deux phénomènes :

- 1° L'action des ions H⁺ et des électrolytes sur les plastides.
- 2° L'action des ions H⁺ et des électrolytes sur les colorants.

MÉTHODE DE COLORATION

La technique utilisée dans la méthode de GRAM a été indiquée précédemment (page 63).

Je rappellerai seulement que la solution colorante employée est une solution de Violet de gentiane phéniquée stabilisée à l'aide du procédé décrit par Ph. LASSEUR, A. DUPAIX, C. MAGUITOT (1931).

Les préparations ont été soumises à l'action décolorante de l'alcool à 95 pendant 20 minutes pour *B. mesentericus niger* et 10 minutes pour *B. subtilis*.

Les numérations ont été effectuées à l'aide d'un oculaire analogue à ceux employés dans la numération des globules rouges.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Je vais tout d'abord examiner les résultats obtenus avec *B. mesentericus niger* (souche COURMONT, ROCHAIX). La marche du phénomène se schématise dans la fig. 1 (p. 114).

A. — Essais effectués avec *B. mesentericus niger*

(SOUCHE COURMONT, ROCHAIX), fig. 1.

1° Solutions tampons

Dans les expériences faites avec les solutions tampons, en première approximation, le nombre des germes colorés en violet-noir décroît de pH = 2,2 à pH = 12. Mais pour obtenir toute cette gamme de pH, il faut utiliser trois types de solutions tampons.

a) De pH = 2,2 à pH = 8, l'expérience porte sur la solution tampon de MAC ILVAINE.

93 % des plastides de *B. mesentericus niger* restent colorés en violet-noir à pH = 2,2 et à pH = 7, leur nombre n'est plus que de 77 % ; le pourcentage des plastides qui ont gardé la coloration violet-noir est de 80 à pH = 7,90.

La courbe diminue donc régulièrement de $\text{pH} = 2,2$ à $\text{pH} = 7$, puis elle croît légèrement de $\text{pH} = 7$ à $\text{pH} = 7,90$. Ce minimum à $\text{pH} = 7$ a été observé dans tous les essais effectués.

b) Pour obtenir des valeurs de pH comprises entre $\text{pH} = 8$ et $\text{pH} = 10$ j'ai utilisé la solution tampon de SÖRENSEN. Dans ces conditions d'expériences le pourcentage des plastides colorées en violet-noir tombe brusquement de 88 à 67 pour les valeurs de pH comprises entre $\text{pH} = 7,80$ et $\text{pH} = 9,80$.

c) Enfin avec la solution tampon de RINGER, la courbe continue à décroître, mais moins rapidement de $\text{pH} = 10$ à $\text{pH} = 12,2$.

J'ai fait varier la concentration des ions H^+ non seulement avec les solutions tampons de MAC ILVAINE, de SÖRENSEN, de RINGER mais encore en utilisant la solution de DAVIS, des solutions d'acide citrique, d'acide sulfurique et de soude.

2° Solution citrate de soude + acide citrique

La solution tampon de DAVIS se comporte d'une façon tout à fait différente de la solution de MAC ILVAINE. Le nombre des plastides colorées croît d'une façon sensible de $\text{pH} = 2$ à $\text{pH} = 6,80$.

3° Solution acide citrique

L'acide citrique par contre n'entraîne pas de modifications sensibles du nombre des plastides restées colorées. Tout au plus peut-on dire qu'il y a une légère augmentation du nombre des plastides qui ont gardé la coloration violet-noir. Mais il n'y a pas assez de points pour construire une courbe qui puisse représenter vraiment l'allure du phénomène. Cependant, la courbe fournie par l'acide citrique étant presque parallèle à

celle obtenue en présence de la solution de DAVIS, de $\text{pH} = 2,3$ à $\text{pH} = 3,80$, les nombres donnés doivent être suffisamment approchés pour en faire état.

4° Solution d'acide sulfurique

Nous venons d'examiner les résultats fournis par un acide très faiblement ionisé. Nous allons observer les mêmes phénomènes, mais considérablement amplifiés avec l'acide sulfurique.

Avec cet acide, le nombre des plastides colorées en violet-noir croît de $\text{pH} = 1,17$ à $\text{pH} = 5,2$.

A $\text{pH} = 1,17$, 88 % des plastides de *B. mesentericus niger* sont décolorées. Mais les germes n'ont pris que très faiblement la coloration de contraste; et les plastides bactériennes sont agglutinées en amas plus ou moins importants sous l'influence des ions H^+ .

5° Solution de soude

Par contre, avec la soude, base fortement ionisée, nous obtenons une courbe qui s'abaisse de $\text{pH} = 7,3$ à $\text{pH} = 12,8$. La chute du nombre des éléments colorés est surtout importante à partir de $\text{pH} = 10$. Le pourcentage d'éléments restés violet-noir n'est plus que de 58.

En résumé:

1° Avec les solutions tampons, le nombre des germes colorés en violet-noir décroît d'une façon irrégulière de $\text{pH} = 2,2$ à $\text{pH} = 12$:

- a) La courbe obtenue passe par un minimum à $\text{pH} = 7$;
- b) Le pourcentage de germes colorés en violet-noir est différent pour deux pH voisins: ce pourcentage est de 80 pour $\text{pH} = 7,90$, et de 84 pour $\text{pH} = 7,80$.

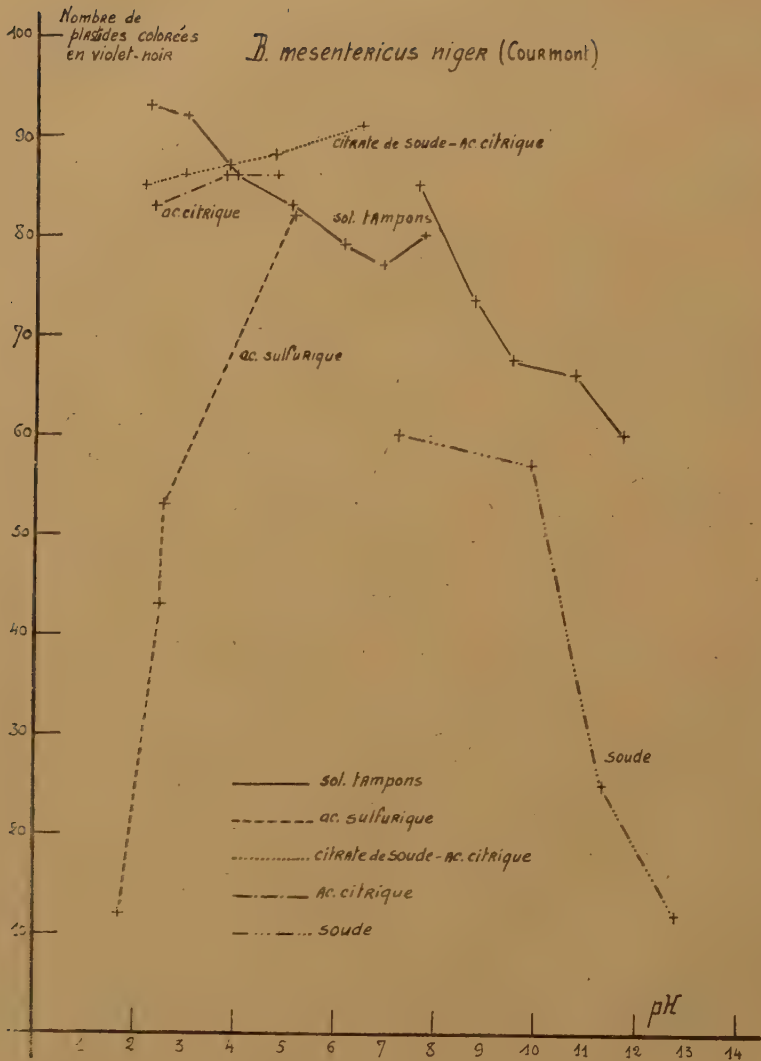


Fig. 1

Décoloration des plastides dans la méthode de Gram, en fonction du pH.

2° Pour la même zone de pH comprise entre $\text{pH} = 2$ et $\text{pH} = 7$, la courbe obtenue avec la solution tampon de MAC-ILVAINE descend, tandis que la courbe acide citrique-citrate de soude s'élève.

3° Le nombre des éléments colorés décroît beaucoup plus rapidement avec la soude qu'avec les solutions tampons pour des mêmes valeurs de pH.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Il semble à première vue que les résultats obtenus aux différents pH ne sont pas comparables. Mais la concentration en ions H^+ n'est pas le seul facteur variable.

Dans cette série d'expériences, il y a deux variables :

1° La concentration en ions H^+ ;

2° La concentration en électrolytes.

Nous avons vu que la présence d'ions H^+ augmente la fixation des colorants acides par les plastides bactériennes, et que les ions OH^- provoquent le phénomène inverse (Ph. LASSEUR, A. DUPAIX, L. GEORGES, 1932-1933).

De même, les travaux de Ph. LASSEUR et de ses Collaborateurs (1) ont montré l'influence des électrolytes sur les variations de fixation des colorants par les éléments microbiens. La fixation du colorant par les plastides bactériennes est extrêmement faible en l'absence d'électrolyte ; par contre, leur présence augmente la fixation du colorant.

Ces faits peuvent expliquer l'allure irrégulière des courbes obtenues avec les solutions tampons. Mais il faut tenir compte d'un troisième facteur : la nature de l'anion. L'influence de l'anion a été signalée par G. BERTRAND et ses élèves (1909-1912-1913) et précisée par KOPACZEWSKI (1910-1912-1913),

(1) Ph. LASSEUR, DOMBRAY et MOREL (1931), Ph. LASSEUR, A. DUPAIX, L. GEORGES (1932), L. GEORGES (1933).

par Ph. LASSEUR, A. DUPAIX, M. OLIVIER (1931), LASSEUR, A. DUPAIX, M. GROSJEAN (1932), LASSEUR, A. DUPAIX, L. GEORGES (1932). LASSEUR et ses Collaborateurs (1931) ont mis en évidence l'action de la composition de la solution tampon sur le volume des plastides bactériennes. En 1932, Ph. LASSEUR a montré l'influence du radical sur la fixation du colorant par les éléments microbiens. L'action différente de la solution tampon de MAC ILVAINE et de la solution acide citrique-citrate de soude peut donc s'expliquer par la différence d'anion.

La diminution rapide du nombre des plastides colorées en violet-noir pour les solutions tampons de SÖRENSEN et de RINGER d'une part, et, pour la soude, d'autre part, trouve une explication dans l'hydratation des éléments bactériens. Ph. LASSEUR, A. DUPAIX (1931), L. GEORGES (1932) ont montré la résistance différente des Bactéries aux ions OH^- , suivant leur *vitesse de décoloration* dans la méthode de GRAM.

Les faits que je viens de décrire paraissent différents de ceux étudiés par E.-W. STEARN et A.-E. STEARN (1924), mais il ne faut pas oublier que je me suis placé dans des conditions autres que les savants américains. E.-W. STEARN et A.-E. STEARN opèrent avec le mélange d'un colorant acide et d'un colorant basique et en présence des électrolytes des solutions tampons, tandis que j'ai fait agir les solutions colorantes sur les plastides en dehors de ces électrolytes. Nous avons vu précédemment les réserves qu'il est nécessaire de faire sur les conclusions de ces auteurs.

Je me trouve également dans des conditions d'expériences différentes de celles de Ph. LASSEUR et de ses Collaborateurs. Ceux-ci opèrent sur des plastides bactériennes en suspension dans de l'eau distillée, et mes essais ont été effectués sur du matériel fixé et desséché. Les résultats obtenus ne sont donc pas exactement comparables.

B. — Essais effectués avec *B. subtilis*

(SOUCHE MICHIGAN) (fig. 2)

Voyons maintenant comment se comporte *B. subtilis* (souche MICHIGAN). La marche du phénomène est schématisé dans la figure 2.

1° Solutions tampons

B. subtilis se comporte sensiblement comme *B. mesentericus niger* dans les expériences faites avec les solutions tampons de MAC ILVAINE, de SÖRENSEN et de RINGER.

Le nombre de germes colorés en violet-noir décroît de pH = 2,2 à pH = 11,80. La courbe obtenue avec *B. subtilis* ne présente pas de minimum entre pH = 2,2 et pH = 7. A pH = 7,9, on obtient deux pourcentages différents de plastides colorées, suivant qu'on utilise la solution tampon de MAC ILVAINE ou de SÖRENSEN.

Pour la solution tampon acide: citrique + phosphate disodique le nombre de plastides colorées en violet-noir est de 78 %; pour la solution tampon acide borique + chlorure de potassium + soude, ce nombre est égal à 84 %. Avec la solution tampon de RINGER, le nombre des germes colorés décroît très rapidement de pH = 10,80 à pH = 11,60.

2° Solution de soude

Avec la soude, le nombre des plastides colorées décroît de pH = 8 à pH = 12,80. La chute du nombre des plastides colorées est surtout importante à partir de pH = 11,7.

3° Solution d'acide sulfurique

En ce qui concerne l'acide sulfurique, le nombre des éléments bactériens colorés en violet-noir croît de pH = 2,90 à

pH = 4,30. Mais il n'y a pas assez de points pour construire une courbe qui puisse vraiment représenter l'allure du phénomène. Cependant, la courbe relative à l'acide sulfurique pour *B. subtilis* est comparable à celle obtenue en présence du même acide pour *B. mesentericus*.

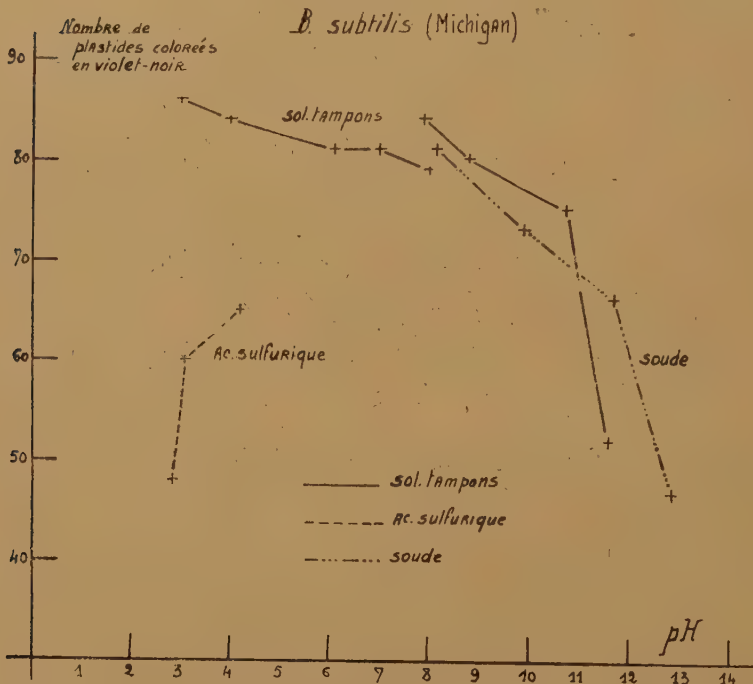


Fig. 2

Décoloration des plastes dans la méthode de Gram, en fonction du pH.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Dans ces conditions d'expériences: 1° la concentration en ions H^+ augmente la fixation du colorant acide par les plastes de *B. subtilis*, et les ions OH^- provoquent le phénomène inverse.

2° La concentration en électrolytes influence la fixation du colorant par les éléments bactériens.

3° L'augmentation de la vitesse de décoloration de *B. subtilis* pour les solutions tampons de SÖRENSEN et de RINGER d'une part, de la soude, d'autre part, s'explique par l'influence du phénomène d'hydratation, décrit par Ph. LASSEUR, A. DUPAIX, L. GEORGES (1932), Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR, M.-A. RENAUX (1934).

En résumé, la quantité de plastides de *B. mesentericus niger* (souche COURMONT, ROCHAIX) et de *B. subtilis* (souche MICHIGAN), colorées par la méthode de GRAM décroît de pH = 2,2 à pH = 7 et de pH = 8 à pH = 12, lorsqu'on s'adresse aux solutions tampons de MAC ILVAINE, de SÖRENSEN, de RINGER et à la solution de soude. Par contre, les variations de pH n'apportent pas de modifications appréciables du nombre des éléments colorés lorsqu'on utilise la solution tampon de DAVIS ou la solution d'acide citrique.

L'acide sulfurique a une action importante sur la décoloration des plastides. Le nombre des germes colorés en violet-noir croît de pH = 1,2 à pH = 5. Dans ce cas, le sens du phénomène est inversé.

CHAPITRE XIII

ÉCLATEMENT DES PLASTIDÈS BACTÉRIENNES

BENIANS (1919-1920) accorde un rôle prépondérant à la membrane dans la réaction de GRAM. Pour cet auteur, la rupture ou la disparition de la membrane entraîne une perte de la résistance des germes à l'action décolorante de l'alcool. BENIANS base son assertion sur l'expérience suivante: après broyage au mortier d'agate, des plastides de *Staphylocoque* cultivé sur milieu solide sont dépourvues de membrane et ces *Cocci* traités par la méthode de GRAM sont complètement décolorés.

P. Martin (1930), dans des recherches sur différentes espèces de *Monilia*, est arrivé à des conclusions analogues. La totalité des cellules de Champignon, triturées au mortier pendant une heure, a perdu la coloration violet-noir après 5 minutes d'action de l'alcool à 95.

BURKE et BARNES (1929) écrasent « *par pression douce et mouvement de rotation* » des cellules de Levures et des plastides de *Staphylococcus aureus* placées entre lame et lamelle. Après fixation, ces auteurs traitent les préparations ainsi obtenues par la méthode de GRAM. Dans ces conditions d'expériences, BURKE et BARNES constatent que le protoplasme expulsé (1) des cellules de Levures et des plastides de *Staphylococcus aureus* est « GRAM-négatif », tandis que les éléments non écrasés sont « GRAM-positifs ».

(1) C'est-à-dire le protoplasme non entouré par la membrane.

BURKE et BARNES concluent de ces faits que chaque facteur qui altère la paroi de la membrane peut affecter la Réaction de GRAM, c'est-à-dire que la Réaction de GRAM est sous la dépendance étroite de la perméabilité de la membrane.

Il ne m'a pas été possible d'écraser, en 10 minutes des plastides de *Staphylococcus aureus* quel que soit le procédé utilisé (1). Cependant j'ai pu observer fréquemment des images absolument semblables à celles que R. MELLON a publié dans le « *Journal of Bactériology* » (Pl. III, fig. 12, 13, 14, 15 et 17). Par contre, je n'ai remarqué que très rarement et cela seulement avec la méthode d'ALESSANDRINI l'image représentée fig. 15, par R. MELLON.

Je n'ai pas l'intention de discuter ici le point de vue phylogénétique auquel s'est placé l'éminent Bactériologiste américain. Je considère ces formes comme n'étant certainement pas pourvues d'une membrane aussi caractérisée que les plastides normales.

Dans les Planches III, IV et V de ce Mémoire, sont réunis les principaux types que j'ai eu l'occasion de rencontrer avec *B. mesentericus niger* et *B. subtilis* (Souche MARCHAL).

A. — Formes éclatées de *B. mesentericus niger*

(Pl. III, fig. 1 et 2; Pl. V)

Pour toute une série de plastides de *B. mesentericus niger* la première modification apparente est une augmentation de volume, en même temps qu'une diminution de la colorabilité. Dans certains cas, la forme de la plastide rappelle celle d'une graine de coton.

La fraction de cytoplasme qui est pourvue de sa membrane est restée colorée en violet-noir intense; l'autre partie est apla-

(1) Ne voulant pas dépasser 10 minutes, temps au delà duquel des modifications cytoplasmiques importantes peuvent se produire.

tie et présente un aspect vacuolaire particulièrement net. La vacuole peut atteindre de très grandes dimensions et, la réduction d'épaisseur du cytoplasme dépourvu de membrane ne permet pas d'obtenir la coloration violet-noir intense.

D'autres fois, la plastide est entièrement transformée. La membrane a laissé fuser le cytoplasme, et de cylindrique l'élément bactérien devient ovalaire, et augmente considérablement de volume. Parfois même les bords du cytoplasme sont découpés d'une façon irrégulière. Il faut donc admettre que la membrane s'est déchirée et là encore, la masse cytoplasmique est colorée en violet quoique la teinte soit plus faible que celle d'une plastide normale.

Dans d'autres cas les deux extrémités de l'élément bactérien sont presque normales, tant au point de vue de leur colorabilité que de leur densité cytoplasmique. Seule la partie centrale a été l'objet de modifications importantes, gonflement considérable et formation de grandes vacuoles.

Dans toutes ces figures la partie de la plastide apparaît dépourvu de membrane. Le cytoplasme qui a fusé s'étale en formant des masses très irrégulières, à contour flou. Incontestablement cette masse cytoplasmique n'est pas entourée d'une membrane et cependant elle est colorée en violet-noir plus ou moins intense, et cela malgré un temps d'action de 20 minutes de l'alcool à 95.

B. — **Formes éclatées de *B. subtilis***

(Souche MARCHAL) (1). — (Pl. IV, fig. 1)

Chez *B. subtilis*, les modifications morphologiques sont encore plus accentuées que chez *B. mesentericus*.

(1) La souche désignée sous le nom de souche MARCHAL provient d'une unité, isolée d'une culture, adressée à M. le Professeur LASSEUR en 1911 par M. le Professeur KOSSEL de Heidelberg.

L'aspect en « *flambeau* » et en « *corne d'abondance* », en « *pince de homard* » est très fréquent. Toute ces figures sont dues à l'éclatement de la cellule par déchirure de la membrane qui laisse fuser le cytoplasme. Parfois, de nombreux éléments paraissent munis d'un fin prolongement (Pl. IV, fig. 1).

Dans certains cas, il a été possible d'observer deux éléments *a* considérablement gonflés, réunis par un élément *b* de dimensions normales, mais ayant perdu la faculté de « *prendre le GRAM* ». Cet élément bactérien coloré en rouge a très peu impressionné la plaque photographique. L'examen microscopique de la préparation avait montré qu'il s'agit d'une plastide plus petite que les éléments « *prenant le GRAM* ».

Toutes les formes éclatées, formes nues, formes vacuolaires de *B. subtilis* ou *B. mesentericus niger*, toutes sans exception « prennent le Gram », mais l'intensité de la coloration varie avec l'épaisseur du cytoplasme (Ph. LASSEUR, M. BENOIT, 1934).

On ne saurait attribuer à des impuretés les formes anormales que j'ai décrites. Les expériences ont été effectuées avec des souches ayant pour origine une seule plastide (2).

(2) L'isolement a été effectué suivant la technique décrite par Ph. LASSEUR, J.-G. MARCHAL, A. DUPAIX (1931).



Fig. 1. — *B. mesentericus niger*
Coloration de Gram; a: formes normales; b: formes anormales



Fig. 2. — *B. mesentericus niger*.
Coloration de Gram; a: formes normales; b: formes anormales

PLANCHE IV

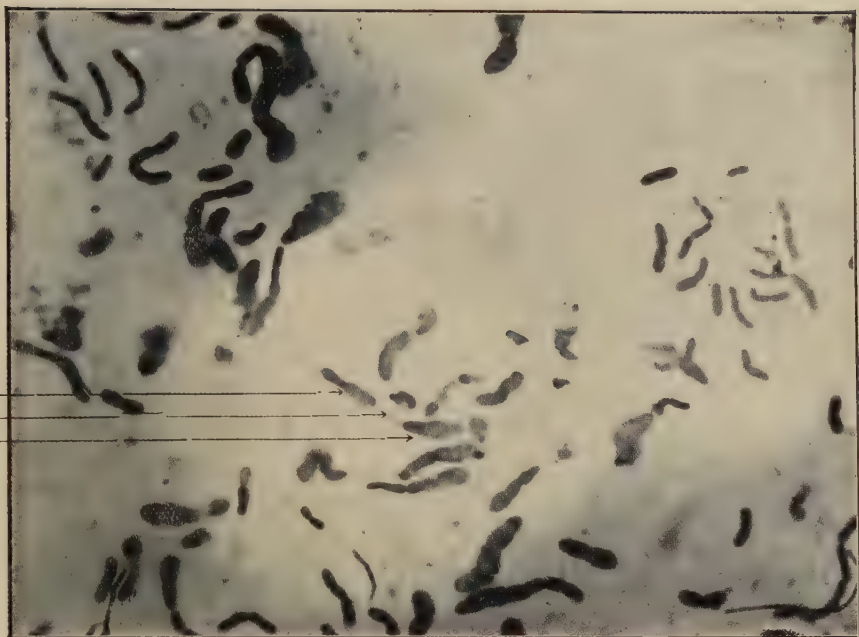


Fig. 1

B. subtilis

[Souche B. MARCHAL

isolée d'une culture adressée en 1911 par M. le P^r KOSSEL (Heidelberg)]

Coloration de Gram.

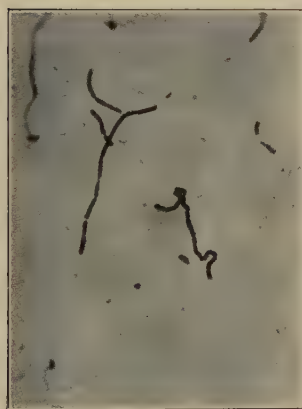


Fig. 2

B. mycoïdes

Coloration de GRAM.



Fig. 3

B. mesentericus niger.



CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° La division des Bactéries en deux groupes: celles qui « prennent le GRAM » et celles qui « ne le prennent pas » est une première approximation: rien de plus.

2° Tous les germes se colorent sous l'action successive du Violet de gentiane et de l'iode; tous se décolorent sous l'action de l'alcool.

3° La « durée de décoloration » (NEIDE) ou la « vitesse de décoloration » (LASSEUR) est extrêmement variable suivant l'espèce bactérienne considérée.

4° On ne peut tenter l'étude de la Réaction de GRAM que si on opère dans des conditions d'expériences rigoureusement définies.

5° La *vitesse de décoloration* des plastides bactériennes est sous la dépendance d'un certain nombre de facteurs.

6° Elle dépend de la nature des réactifs utilisés: solutions colorantes (Violet de gentiane, Fuch sine de GRAM); solution iodo-iodurée; décolorant.

7° Elle varie avec l'espèce, avec le stade du cycle d'évolution, avec le milieu de culture (nature et réaction); avec la réaction du milieu dispersif et avec différents agents qui peuvent modifier l'état physico-chimique de la plastide bactérienne.

8° La réaction de GRAM nécessite l'emploi de solutions colorantes phéniquées stabilisées.

9° De toutes les solutions stabilisées ou soit disant telles, seules les solutions colorantes stabilisées par le procédé de Ph. LASSEUR, A. DUPAIX, C. MAGUITOT (1931) donnent des résultats constants.

10° De telles solutions sont, en effet, remarquablement stables, et de vieilles solutions (âgées de 5 ans et demie) possèdent encore un pouvoir tinctorial très élevé: 93 % des plastides

de *Staphylococcus aureus* restent colorées en violet-noir, après une heure d'action de l'alcool à 95.

11° La solution iodo-iodurée doit être de préparation récente.

12° La *vitesse de décoloration* des Bactéries varie avec le décolorant. L'emploi de décolorants convenables permet de différencier certaines Bactéries dites « *ne prenant pas le GRAM* ».

13° Il est nécessaire d'utiliser une solution de contraste de faible concentration (à 0,031 %) pour éviter tout phénomène de déplacement ou de « *sur-coloration* ».

14° La *vitesse de décoloration* des plastides bactériennes varie avec le stade du cycle d'évolution. Pour toutes les Bactéries, la résistance à l'alcool diminue avec l'âge de la culture.

15° Les bâtonnets germinatifs de *B. mesentericus* et de *B. subtilis* ont une durée de décoloration supérieur à 10 minutes.

16° La nature du milieu de culture peut modifier la *vitesse de décoloration* des germes.

17° L'existence de la membrane est admise par la majorité des Auteurs.

18° Aucune des nombreuses théories sur la perméabilité de la membrane n'est capable d'interpréter l'ensemble des phénomènes observés.

19° Différents facteurs modifiant la perméabilité de la membrane peuvent jouer un rôle dans la réaction de GRAM.

20° Les ions OH— augmentent la fixation des colorants basiques et les ions H+ celles des colorants acides par les plastides bactériennes.

21° Les ions OH— déterminent une hydratation des plastides bactériennes.

22° Les Bactéries « *prenant le GRAM* » sont plus sensibles à l'action des ions H+ et moins sensibles à l'action des ions OH— que les Bactéries « *ne prenant pas le GRAM* ».

23° Le nombre des plastides de *B. mesentericus niger* et de

B. subtilis colorés en violet-noir décroît de pH = 2,2 à pH = 7 et de pH = 8 à pH = 12, lorsqu'on s'adresse aux solutions tampons de MAC ILVAINE de SÖRENSEN, de RINGER et à la solution de soude.

24° Les variations du pH n'apportent pas de grandes modifications du nombre des éléments colorés en violet-noir lorsqu'on utilise la solution tampon de DAVIS (de pH = 2 à pH = 6) ou à la solution d'acide citrique (de pH = 2 à pH = 5).

25° Par contre l'acide sulfurique a une action importante sur la décoloration des plastides bactériennes. Fait non prévisible, le nombre des éléments colorés en violet-noir augmente de pH = 1 à pH = 5.

26° La fixation du colorant est encore sous la dépendance de la concentration en électrolytes, de la nature de l'anion et de l'hydratation des plastides.

27° Toutes les plastides éclatées, les plastides « nues » de *B. mesentericus* et de *B. subtilis* « prennent le GRAM » mais l'intensité de la coloration varie avec l'épaisseur du cytoplasme.

28° La membrane, dont le rôle est fondamental dans la coloration des plastides vivantes, ne conditionne pas à elle seule l'aptitude qu'ont certaines Bactéries, desséchées et fixées à se colorer en Violet-noir dans la Réaction de GRAM.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ALBERT (R. et W.). — Chemische Vorgänge in der abgeteten Hefezellen. *Cent. f. Bakt.* Abt. 11, Bd 7., N° 21, 1901, p. 737-742.
- ATKINS. — *Journ. of Bact.*, 1920, 5, p. 321.
- BARY (P.). — Les Colloïdes. Dunod. Paris, p. 409-429, 1921.
- BENIANS (T.-H.-C.). — A further investigation into the principles underlying GRAM'stains, with special reference to the bacteria cell membrane. *Journ. Path. and Bact.* Cambridge, 1919-1920, t. 23, p. 401-402.
- BOUTARIC. — Les Colloïdes et l'état colloïdal. Alcan, Paris, 1931.
- BOUTARIC. — Contribution à l'étude de la floculation des suspensions de résine mastic. *J. de Chimie-physique*, 23, n° 10, 25 déc. 1926.
- BRUDNY. — Ueber die Beziehung zwischen der Falbarkeit der Bakterien nach GRAM und ihrer Permeabilität. *Centr. f. Bakt.*, 1908. Bd 21, Abt II, p. 62-80.
- BURKE. — Notes on the GRAM'stain with description of a new methode. *Journ. of Bact.*, 1922; V. 7, p. 159.
- BURKE and BARNES. — The cell wall and the GRAM reaction. *Journ. of Bact.* 1929, vol. 18, n° 2, p. 69.
- BURKE and GIBSON. — The GRAM reaction and the electric charge of Bacteria, 1933, vol. 26, n° 2.
- CASTELLI (T.). — GRAM-resistance of Blastomyces. *Bol. dell. Istituto sierotherapico Milanese*, 1931, p. 816-821.
- CHURCHMANN (J.-W.). — Effect of hardening and fixation. *Proc. Soc. exper. Biol. and Med.*, 25, p. 237 et suiv., 1928.
- CLARK (W.-M.). — The determination of hydrogen ions. Williams et Wilkins Compagny, 1923.
- CLAUDIUS. — Méthode de décoloration à la fois simple et constante des microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, t. II, 1897, p. 332-335.
- COLLANDER (R.). — Ueber die Permeabilität von Kolloïdium-membranen. *Soc. Sc. Fennica Comm. Biol.*, t. II, n° 6, 1926.

- COUDRAY (G.). — Contribution à l'étude de la coloration de Gram. *Thèse Fac. Pharmacie, Nancy*, 1929.
- BACH et DELETANG. — *C. R. Soc. de Biologie*, 107, 1931, p. 666-668.
- DELETANG. — Contribution à l'étude de la Réaction de Gram. *Thèse Fac. Pharmacie, Paris*, 1933.
- DEUSSEN. — Die Gramsche Bakterienfärbung, ihr Wesen und ihre Bedeutung I. *Biochem Ztschr.* Berlin, 1920, p. 123-141.
- DUPAIX (A.). — Etude morphologique et biologique de *B. caryocyanus* BEIJERINCK-DUPAIX. *Thèse Fac. Pharm. Nancy* 1933, Libr. Le François.
- DUPAIX et RENAUX. — Application du phénomène de BOUTARIC à la préparation des solutions colorantes. *Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm.*, 1932, fasc. V.
- EISENBERG (Ph.). — The Studien zur Ectoplasma-theorie. *Cent. f. Bak.* Abt. I, Bd 56, p. 193-201.
- EISENBERG (Ph.). — Ueber die Tüchedifferenzierung gramnegativer Bakterien. *Cent. f. Bakt.*, Abt. I, Bd 56, p. 183-186.
- EISENBERG (Ph.). — Ueber Gram-electric Zuchtung. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 1918, Bd 44, p. 1079 et suiv.
- EISENBERG (Ph.). — Ueber Spezifische Adsorption in Bakterien. *Cent. f. Bakt.*, Abt I, Bd 8, 1918, p. 72 et suiv.
- EISENBERG (Ph.). — Mitteilung über die Variabilität der Schleimbildungsvermögens und die Gramfestigkeit. *Cent. f. Bakt.* Abt I, Bd 82, p. 401-405.
- FRIEDLANDER (C.). — Die Microcoken der Pneumonie. *Forschritte der Medizin.* Bd 1, 1883, n° 22, p. 715-733.
- GEORGES (L.). — Contribution à l'étude du mécanisme du phénomène de Boas. *Thèse Fac. Pharm.*, Nancy, 1933.
- GIRARD (P.). — La perméabilité sélective de la membrane. Ses effets physiques et chimiques. Rapport et discussions sur des questions d'actualité. *Institut International de Chimie Solvay, troisième conseil de Chimie*, 1928, p. 259-297.
- GOTTSTEIN. — Ueber entfarbung gefärbten Iehlherne und Microorganismen durch Salzlösungen. *Forschritte der Medizin*, III, 1885, p. 627-630.
- GRAM (C.). — Ueber die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnittlung Trochen Präparaten. *Forschritte des Medizin.* Bd 2, 1884, n° 6, p. 185-189.

- GRIMME (V.-A.). — Die Wichtigsten Methoden der Bakterien Färbung in ihrer Wirkung auf die Membran den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle. *Cent. f. Bakt.* Abt I, Bd 32, 1902, p. 1 et suiv.
- GUERBET, MAYER et SCHOEFFER. — Sur les réactions microchimiques des corps gras et la réaction de Gram. *C. R. des S. et M. de la Société de Biologie*, t. 68, 1910, p. 353-356.
- HILL (J.-N.) and WITE (E.-C.). — Sodium chloride media for separation of certain Gram-positive cocci from Gram-negative bacilli. *Journ. of Bact.* 18, 43-47, 1929.
- HOBER (R.). — The first Reynold A. Spaeth memorial lecture. The present conception of the structure of the plasma-membrane. *Biol. Bull.*, vol. 58, n° 1, 1930.
- HOBER (R.). — Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1922.
- HOGGE (A.). — *Annales des maladies génito-urinaires*, t. II, 1893, p. 281-294.
- HYMANS VAN DER BERG. — Sur l'attitude du Gonocoque envers la coloration de Gram. *Cent. Bakt.* Abt I, Bd 20, 1896, p. 785-792.
- KISSKALT (K.). — Contribution à l'étude de l'immunité naturelle, 2^e partie. *Ztschr. f. Hygiene*, t. 47, 1904, p. 243-258.
- KOPELOFF et BEERMANN. — Modified Gram stains. *Journ. Inf. Dis.* 21, 1923, p. 480.
- KOPELOFF and COHEN. — Further Studies on a modification of the Gram stain. *Journ. of Bact.*, 1928, n° 1, p. 12.
- LASSEUR (Ph.). — Contribution à l'étude de *B. chlororaphis* S. et G. *Thèse Sciences*, Nancy 1911.
- LASSEUR et BENOIT. — Observation sur la méthode de Gram. *Trav. du Lab. Microb. Fac. Pharm.*, Nancy, 1934, fasc. VII.
- LASSEUR (Ph.) et BENOIT (M.). — Observations sur la coloration de GRAM. *C. R. Acad. Sc.*, t. 199, n° 26, pp. 1680-1682, 1934.
- LASSEUR et ses Collaborateurs. — Fixation des Colorants par les éléments bactériens. *Trav. du Lab. Microb. Fac. Pharm.*, Nancy 1933, fasc. VI, p. 13-55.
- LASSEUR, DUPAIX et GEORGES. — Observations sur la perméabilité. Perméabilité des cellules animales et végétales. Perméabilité des éléments microbiens. *Trav. du Lab. Microb. Fac. Pharm.*, Nancy, fasc. V, 1932.

- LASSEUR, DUPAIX et GEORGES. — Influence de la solution tampon. Rôle de l'anion. *Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm.*, Nancy, 1932, Fasc. V.
- LASSEUR, DUPAIX et MAGUITOT. — Application du phénomène de Boutaric à la préparation des solutions colorantes. *Trav. du Lab. Microb. Fac. Pharm.*, 1931, Fasc. IV.
- LASSEUR et FRIBOURG. — Transport électrique des plastides bactériennes. *Trav. du Lab. Microb. Fac. Pharm.*, Nancy 1928, Fasc. I.
- LASSEUR, FRIBOURG, DUPAIX, LECAILLE et SERRA. — Etude sur le mécanisme du phénomène de Charrin et Roger. Transport électrique des Bactéries et des Champignons. *Trav. du Lab. Microb. Fac. Pharm.*, Nancy 1930, Fasc. III.
- LASSEUR, HAEUSSLER et DUPAIX. — La notion qualitative dans la nutrition. A propos de la polémique Mitscherlich - Rippel. *Trav. du Lab. Microb. Fac. Pharm.*, Nancy 1930, Fasc. III.
- LASSEUR et SCHMITT. — Etude de la réaction de Gram. *Ann. Inst. Past.*, 1927, t. 41, p. 554 et suiv.
- LASSEUR et VERNIER. — Contribution à l'étude de B. Le Monnier-Lasseur. *Bull. de la Soc. des Sciences de Nancy*, Série 4, t. 2, Fasc. 2, 1923-24, p. 73-131.
- LASSEUR et VERNIER. — Membrane et ectoplasme. *Trav. du Lab. Microb. Fac. Pharm.*, Nancy 1933, Fasc. VI.
- LEGROUX (R.) et MAGROU (S.). — Etat organisé des colonies bactériennes. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 34, 1920, p. 417-431.
- LOEFFLER. — Aus den Hygienischen Institut, zur Gramschen Färbungsmethode. *Deutsch Medizin Wochenschrift*, 1906, n° 31, p. 1243-1244.
- LYON (M.-W.). — Aceton as a decolorizer in Gram'staining method. *J. Ann. Med. Ass. Chicago* 1920, t. 75, p. 1017 et suiv.
- MARCHAL (J.-G.). — Contribution à l'étude de la Variation en Microbiologie. *Thèse Doctorat ès Sciences*, Nancy, 1932.
- MEYER (A.). — Die Zelle der Bakterien. G. Fischer, Iéna 1912, 285 p.
- MEYER (A.). — Notiz ueber das Aussehen der Bakterien im Ultramikroskop. *Arch. f. Protost.*, 1912, t. 24, p. 76-79.
- MOSS (E.-S.). — Improved method for staining. *United States Veterans' bureau Medical Bulletin*, 247-250, 1928.
- NEIDE. — Die Alkoholenfärbung der nach Gram gefarhten Bakterien als spezifische diagnose in Verbindung, mit einer Untersuchung der für die Gramfarbung en Betracht kommenden faktoren. *Cent. f. Bakt.* Abt I, Bd 35, 1904, p. 508 à 521.

- NICOLLE (M.). — Méthode de recherche des microorganismes qui ne se colorent pas par le procédé de Gram. Sceaux, Imprimerie Charaine et C^{ie}.
- NICOLLE (M.). — Pratique des colorations microbiennes (Méthode de Gram modifiée et Méthode directe). Sceaux, Imprimerie Charaine et C^{ie}.
- NICOLLE (Ch.). — Modification de la méthode de Gram (ou substitution d'une solution bromo-bromurée à la solution iodo-iodurée ordinaire). *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1903, t. 4..
- OSTWALD (W.). — A. handbank of colloïd-chemistry. I. et A. Churchill, Londres, 1929.
- SCHUMACKER (J.). — Ectoplasm of bacteria in relation to Gram's stain to bacterial nuclei and to chemistry of disinfection. *Cent. f. Bakt. Abt I*, 1928, p. 107, 161-180.
- SCHUMACKER (J.). — Coloration de Gram. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1931, n° 3, p. 116.
- SCHUMACKER (J.). — Zur Gramschen Färbung. *Cent. f. Bakt. Abt I*, Bd 93, 1924, p. 266-268.
- SCHUMACKER (J.). — Zur Gramschen Färbung. *Cent. f. Bakt. Abt. I*, Bd 98, 1926, p. 104-112.
- SCHUMACKER (J.). — Ueber des Nachweiss des Bakterien Kerns und seine chemische Zusammensetzung. *Cent. f. Bakt. Abt I*, Bd 97, 1926, p. 96-97.
- SERRA (J.-P.). — Pouvoir bactéricide des matières colorantes dérivées du Triphénylméthane. *Thèse Fac. des Sc.*, Nancy, 1932.
- SOLARINO (S.). — La résistance au Gram des Bactéries. La phase Gram-négative dans le développement des Bactéries Gram-positives. *Bull. di Ist. Siero. Milanese*, 9, 1930, p. 125-128.
- STERN (E.-W.) et STERN (A.-E.). — Differential action of oxydizing agents on certain Gram-positive and Gram-négative organism. *Journ. of Infection*, 1930, Des 4 b, 500-513.
- STERN (E.-W.) et STERN (A.-E.). — Nature of Gram compound and its bearing on mechanism of staining. *Journ. of Bacteriology*, 1930, p. 287-295.
- STERN (E.-W.) et STERN (A.-E.). — The chemical mechanism of bacterial behavior. *Journ. of Bacteriology*, 1924, vol. IX, p. 443-487.
- STOWALL (W.-O.), NICHOLS (M. S.) et VINCENT (V.). — Influence of pH on selective bacteriostatic action of Gentian violet on members of colon groups organism. *Journ. of Laboratory and Clinical medicine*, 13, 1928, p. 1122-1126.

UNNA. — Die Entweiklung der Bakterienfärbung einhistorich
Kritische, uebersicht. *Cent. f. Bakt.* Bd 3, 1888, p. 22 et
suiv.

WEIGERT. — Ueber eine neue, Methode zur Färbung von Fi-
brin und von Micro-organismen. *Forschritte der Medezin* V.,
1887, p. 228-232.

ZETTNOW. — Romanowski's Färbung bei Bakterien. *Ztschr. f.*
Hyg., t. 30, 1899, p. 1-19.

ZETTNOW. — Ueber Geisselfärbung zur Morphologie der Bak-
terien. *Ztschr. f. Hyg.*, t. 30, 1899, p. 95-107.

ZETTNOW. — Kleine Beiträge zur Morphologie der Bakterien.
Ztschr. f. Hyg. Bd 85, 1918, p. 17-32.

ZIRONI. — Sulli fase di sviluppo della resistenza al Gram nei
germi. *Boll. Ist. Siero. Milanese* I, p. 239, 1920.

ZSIGMONDY. — Chimie colloïdale. Dunod. Paris 1926, 539 p.

VU:

Nancy, le 20 décembre 1934.

Le Président de thèse:

Ph.-L. LASSEUR.

VU ET APPROUVÉ:

Nancy, le 21 décembre 1934.

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie:

SEYOT.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER:

Nancy, le 22 décembre 1934.

Le Recteur de l'Académie:

Président du Conseil de l'Université.

BRUNTZ,

